

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Barbora Vojtková

**Xenodiagnostika infekcí *Leishmania major* u symptomatických
a asymptomatických hlodavců**

Xenodiagnosis of *Leishmania major* infections in symptomatic and
asymptomatic rodents

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 8. 2016

Bc. Barbora Vojtková

Poděkování

Za velkou trpělivost, cenné rady a pomoc při časově náročných experimentech děkuji především své školitelce Jovaně Sádlové. Dále Terce Leštinové a Táně Spitzové za velkou podporu a pomoc při provádění a vyhodnocování ELISA-testů. Také děkuji docentu Janu Votýpkovi a docentu Danielu Fryntovi za provedení kvantitativní PCR a za pomoc se statistickými analýzami a celému kolektivu naší laboratoře za vytvoření přátelské atmosféry, plné humoru a optimismu.

A na závěr patří mé poděkování celé rodině za podporu během studia, hlavně mamince, bez jejíž podpory a nasazení bych svou práci nikdy nedovedla do této podoby.

ABSTRAKT

Leishmanióza je onemocnění kolující v endemických oblastech mezi flebotomy (Diptera: Phlebotominae) a rezervoárovými hostiteli, kterými jsou v případě *Leishmania major* především hlodavci (Rodentia), u nichž má leishmanióza u často asymptomatický průběh. Pro přenos a udržení parazita v přírodě je podstatná infektivita hostitelů pro flebotomy, přičemž jediná metoda schopná přímo testovat infektivitu je xenodiagnostika. Hlavním cílem této diplomové práce je zavést laboratorní model pro studium xenodiagnostiky a infekcí *L. major* na inbredních BALB/c myších a tento model poté aplikovat na potenciální rezervoárové hlodavce rodu *Mastomys*.

BALB/c myši byly nakaženy intradermální inokulací infekčních stádií *L. major* (vypreparovaných ze střev flebotomů) společně s homogenátem slinných žláz *Phlebotomus duboscqi*, infikované myši byly poté po dobu deseti týdnů vystavovány samicím *P. duboscqi*. Dvě použité inbrední linie myší BALB/c se výrazně lišily jak v manifestaci onemocnění, tak v infektivitě pro flebotomy. U myší BALB/c OlaHsd se tvořily v průměru větší léze (až 10 mm) a infektivita byla zaznamenána již 2. týden po nakažení, v průběhu pokusu dosáhla až 20,1 %. U myší BALB/c AnNCrI se vyvinuly jen malé léze (do 2 mm), které se průměrně 6. týden po infekci uzavřely v noduly. Myši byly pro přenašeče infekční až 4. týden po nakažení a infektivita nepřesáhla 4 %. Změna hmotnosti nebyla ani u jedné z linií dobrým ukazatelem onemocnění, narozdíl od hladiny tvorby protilátek proti *L. major*, která dobře korelovala s počtem parazitů v těle myší.

V rámci xenodiagnostiky na myším modelu byl také zjištěn významný vliv opakovaného sání flebotomů na vývoj onemocnění a infektivitu hostitelů. U myší BALB/c OlaHsd se léze vytvořily v průměru o týden dříve a na konci pokusu byly v průměru o 3,5 mm větší, než u myší nevystavených flebotomům. U myší kmene BALB/c AnNCrI se léze nebo noduly vytvořily pouze u skupiny vystavené xenodiagnostickým pokusům. Sání *P. duboscqi* zvýšilo i diseminaci parazitů v těle myší a jejich infektivitu pro přenašeče.

Metoda experimentální infekce a xenodiagnostiky byla následně aplikována na hlodavce druhu *Mastomys natalensis*, potencionální rezervoárové hostitele leishmanióz v subsaharské Africe. Samice *M. natalensis* nevykazovaly v průběhu třiceti pěti týdnů po nákaze žádné známky onemocnění, i když paraziti byli pomocí PCR detekováni ve čtyřech typech tkání. Žádný flebotom z 638 vyšetřených se nenakazil sáním na inokulovaném uchu a nenakazili se ani fle-

botomové, kteří sáli na zvířatech vystavených předtím sání infikovaných flebotomů. Na základě těchto výsledků tedy nelze potvrdit roli *Mastomys natalensis* jako rezervoárového hostitele *Leishmania major*.

Klíčová slova: xenodiagnostika, leishmanióza, rezervoárový hostitel, *Mastomys natalensis*, BALB/c myši, *Phlebotomus*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease circulating in endemic areas between sand flies (Diptera: Phlebotominae) and reservoir hosts, which - in the case of *Leishmania major* - are principally rodents (Rodentia). Unlike in human patients, leishmaniasis is often asymptomatic in animal hosts. For transmission and maintenance of the parasite in nature, infectiousness of hosts for sand flies is essential; and the only method to directly test the infectiousness is xenodiagnosis. The main objective of this thesis is to establish a laboratory model for studying xenodiagnosis with *L. major* on inbred BALB/c mice and then to apply this model to potential reservoir rodents from the genus *Mastomys*.

BALB/c mice were infected by intradermal inoculation of infective stages of *L. major* (isolated from sand fly guts) together with salivary gland homogenates from *Phlebotomus duboscqi*; infected mice were then exposed to *P. duboscqi* females for a period of ten weeks. Two inbred lines of BALB/c mice differed significantly in both the manifestation of the disease and infectiousness for sandflies. In BALB/c OlaHsd mice, great lesions were formed (up to 10 mm), mice were able to infect sand flies from the 2nd week after infection and their infectiousness reached up to 20.1% during the experiment. In BALB/c AnNCrl mice, only small lesions were formed (up to 2 mm) which closed into nodules in an average of six weeks after infection. Mice became infectious for the vectors only after the fourth week after infection and the infectiousness did not exceed 4 %. Change in the body weight was not a good indicator of a disease progress in any of the lines, because it did not differ between experimental and control groups. While antibodies were a good indicator of acute diseases progress, because they positively correlated with number of parasites in the body of mice. The xenodiagnosis mouse model showed also a significant effect of repeated feeding of sand flies on the disease development and host infectiousness. In BALB/c OlaHsd mice, lesions were formed in average one week earlier and they developed to a larger size at the end of the experiment than in mice unexposed to sand flies. In BALB/c AnNCrl mice, lesions or nodules were formed only in groups exposed to xenodiagnosis. Feeding of *P. duboscqi* led also to increased dissemination of the parasites in the body of mice and higher infectiousness for the vectors.

The experimental infection and xenodiagnosis method was subsequently applied to the rodent species *Mastomys natalensis*, a potential reservoir host of leishmaniasis in subSaharan Africa. *Mastomys natalensis* females showed no signs of disease over thirty-five weeks after

infection, although the parasites were detected by PCR in four types of their tissues. None of the 638 tested sand flies was infected by feeding on the inoculated ear. In parallel experiments, sand flies feeding on animals previously exposed to feeding of infected sand flies remained uninfected. Based on these results, the role of *M. natalensis* as a reservoir host of *Leishmania major* cannot be confirmed.

Keywords: xenodiagnosis, leishmaniasis, reservoir host, *Mastomys natalensis*, BALB/c mice, *Phlebotomus*

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Leishmanióza	12
2.1.1 Typy leishmanióz z hlediska klinických příznaků	13
2.1.2 Typy leishmanióz z hlediska přenosu	16
2.2 Rezervoárový hostitel	18
2.2.1 Definice rezervoárového hostitele	18
2.2.2 Role hlodavců jako rezervoárových hostitelů <i>Leishmania major</i>	20
2.2.3 Imunitní odpověď savčího hostitele proti leishmaniím	23
2.3 Xenodiagnostika	26
2.3.1 Charakteristika xenodiagnostiky a její typy	26
2.3.2 Příklady využití xenodiagnostiky v minulosti a dnes	27
3 MATERIÁL A METODIKA	31
3.1 Složení použitých roztoků	31
3.2 Chov hlodavců	32
3.3 Chov flebotomů	34
3.4 Pitvy střev samic a vyšetřování vzorků střeva	35
3.5 Příprava slinných žláz	36
3.6 Experimentální infekce flebotomů	37
3.6.1 Kultivace leishmanií	37
3.6.2 Experimentální infekce flebotomů	37
3.7 Experimentální infekce hlodavců	37
3.8 Xenodiagnostika	38
3.8.1 Schéma xenodiagnostického pokusu s myšmi kmene BALB/c	39
3.8.2 Schéma xenodiagnostického pokusu s hlodavci <i>Mastomys natalensis</i>	41
3.9 Přenosové pokusy	42
3.10 Izolace DNA	43
3.11 Kultivace leishmanií ze tkání <i>Mastomys natalensis</i>	44
3.12 Kvantitativní PCR	44
3.13 ELISA	44

3.14 Statistika	45
4 VÝSLEDKY	46
4.1 Pokusy s myšmi kmene BALB/c OlaHsd	46
4.1.1 Změna hmotnosti a dynamika vzniku lézí	46
4.1.2 Distribuce parazitů v těle hostitelů a tvorba protilátek proti <i>L. major</i>	50
4.1.3 Infektivita hostitelů pro přenašeče <i>P. duboscqi</i>	53
4.2 Pokusy s myšmi kmene BALB/c AnNCrI	57
4.2.1 Změna hmotnosti a dynamika vzniku lézí	57
4.2.2 Distribuce parazitů v těle hostitelů a tvorba protilátek proti <i>L. major</i>	59
4.2.3 Infektivita hostitelů pro přenašeče <i>P. duboscqi</i>	61
4.3 Korelační analýza protilátkové imunitní odpovědi a množství parazitů	63
4.4 Pokusy s hlodavci <i>Mastomys natalensis</i>	64
4.4.1 Vnější manifestace onemocnění a distribuce parazitů v těle hostitelů	64
4.4.2 Infektivita hostitelů pro přenašeče <i>P. duboscqi</i>	65
4.4.3 Přenosové pokusy	66
5 DISKUZE	68
6 SHRNUÍ	74
7 POUŽITÁ LITERATURA	76

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Leishmaniózy jsou lidská onemocnění způsobená prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), kteří jsou přenášeni flebotomy (Diptera: Psychodidae) a v ohniscích udržováni většinou mezi rezervoárovými hostiteli.

Jedním z dlouhodobých cílů naší laboratoře je hledání rezervoárových hostitelů leishmanií v oblastech, kde takový hostitel není znám. V posledních letech se soustředíme hlavně na oblast subsaharské Afriky, kde je nejasná epidemiologie hned několika druhů leishmanií (*L. major*, *L. donovani*, *L. tropica*, *Leishmania* sp. z komplexu *L. enriettii*). Kromě sporadických terénních odchytů se zabýváme hlavně laboratorním testováním vnímavosti zvířat a jejich infekitivity pro flebotomy pomocí xenodiagnostiky.

Abychom mohli testovat divoké hlodavce, je nutno nejprve zavést metodiku infekcí a xenodiagnostiky na laboratorním zvířecím modelu, který bude k danému druhu leishmanie vnímavý. Zvolili jsme myši kmene BALB/c, protože je to nejčastější modelový hlodavec pro studium leishmanióz. Tyto myši jsou k nákaze *L. major* vysoce citlivé, projevy onemocnění jsou progresivní a symptomatické (tvorba lézí v místě inokulace). Metoda infekce zvířat, kterou zavádíme, má co nejvíce odpovídat přirozené situaci v přírodě, proto inokulujeme infekční stádia parazita vypreparovaná ze střev nakažených flebotomů včetně obsahu thorakální části střeva. K takto vytvořené infekční dávce přidáváme ještě sliny flebotomů. Pro xenodiagnostické pokusy budeme používat přirozeného přenašeče *L. major* v endemických oblastech subsaharské Afriky, druh *Phlebotomus duboscqi*.

Součástí diplomové práce by mělo být také posouzení, zda opakované vystavení infikovaného hostitele flebotomům ovlivňuje rozvoj infekce *L. major*. Takový efekt zatím zkoumán nebyl, ačkoliv je již dlouho známo, že přidání slin flebotomů do infekčního inokula zvyšuje projevy onemocnění a naopak vystavení hostitele slinám flebotomů před nákazou má protektivní účinek proti leishmanióze.

Metody infekce a xenodiagnostiky chceme po ověření na myších BALB/c aplikovat na hlodavce druhu *Mastomys natalensis*. Tito hlodavci obývají celou subsaharskou Afriku včetně endemických oblastí leishmanióz a vzhledem k jejich ekologii i záchytů leishmanií v odchycených asymptomatických jedincích jsou považováni za možné rezervoárové hostitele *L. major* a *L. donovani*. Naše pokusy by měly přispět k potvrzení či vyvrácení role těchto hlodavců.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Zavést laboratorní model pro studium xenodiagnostiky a vývoje infekce *L. major* u myší kmene BALB/c a sledovat vliv sání flebotomů na rozvoj infekce.
 - a) Sledovat rozvoj infekce - vnější manifestace onemocnění (tvorba lézí, změna hmotnosti zvířat), distribuci parazita v těle hostitele (pomocí qPCR), tvorbu protilátek proti *L. major* (pomocí ELISA).
 - b) Sledovat časový průběh infekivity hostitelů pro flebotomy a srovnat infektivitu různých částí těla hostitele.
 - c) Zjistit, zda má opakované sání flebotomů vliv na rozvoj infekce *L. major* u myší BALB/c a jejich infektivitu pro flebotomy.

- 2) Aplikovat zavedený laboratorní model na hlodavce druhu *Mastomys natalensis* a ověřit tak potenciál tohoto druhu sloužit jako hostitel *L. major*.
 - a) Sledovat rozvoj infekce - vnější manifestace onemocnění (tvorba lézí, změna hmotnosti zvířat), distribuci parazita v těle hostitele (pomocí qPCR).
 - b) Sledovat infektivitu hostitelů pro flebotomy.
 - c) Ověřit, zda *L. major* dokončí v *M. natalensis* životní cyklus pomocí sání nenakažených flebotomů na jedincích infikovaných předchozím sáním experimentálně nakažených flebotomů.

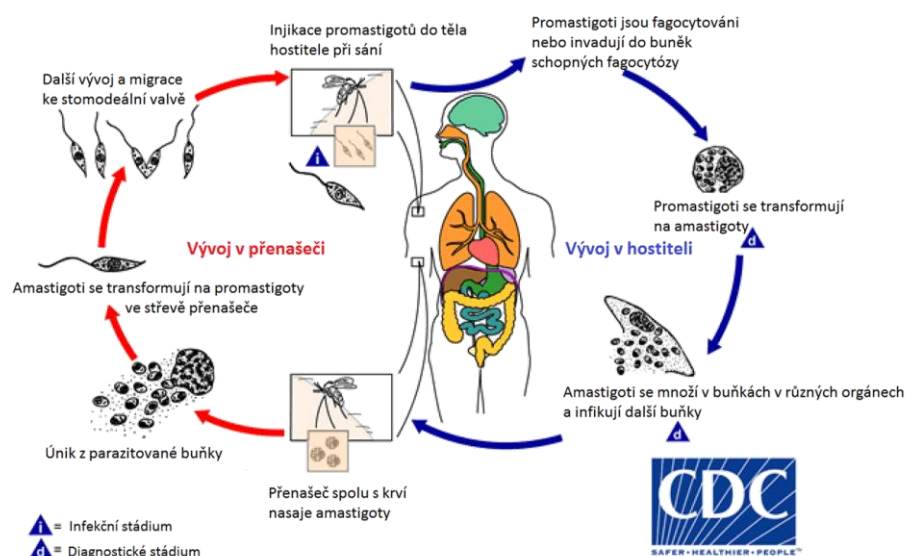
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 *Leishmanióza*

Leishmanióza je infekční onemocnění způsobené parazitickými prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Leishmanie mají digenetický životní cyklus, kolují mezi dvoukřídlým krevsajícím hmyzem a savčím hostitelem včetně člověka. Medicínsky a veterinárně významnými přenašeči jsou samice rodu *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) ve Starém světě a *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) v Novém světě. Onemocnění se vyskytuje ve více než 98 zemích světa převážně v subtropickém a tropickém pásu. Je vyvoláno komplexy 6-7 druhů leishmanií s 15-20 poddruhy (WHO, 2010). Největší dopad má leishmanióza v rozvojových zemích (McGwire *et al.*, 2014), naprostá většina případů viscerální formy onemocnění pochází z východní Afriky, indického subkontinentu a Brazílie (Alvar *et al.*, 2012). Uvádí se, že přibližně 350 milionů lidí je leishmaniózou ohroženo a více jak 1,2 milionů lidí se nově nakazí každý rok (WHO, 2010).

Životní cyklus leishmanií je schématicky znázorněn na obrázku 2-1. Flebotom spolu s krví hostitele nasaje i amastogoty (bezbičíkatá stádia, intracelulární forma parazita). V přenašeči prodělávají leishmanie složitý vývoj zahrnující různá funkčně i morfologicky odlišná stádia (shrnuto v Bates, 2007; Ramalho-Ortigao & Saraiva, 2010; Dostálová & Volf, 2012). Nasátá krev spolu s amastigoty je ve střevě přenašeče do několika hodin obklopena peritrofickou matrix, chitinózním obalem vylučovaným buňkami střevního epitelu. Během trávení krve se amastigoti v endoperitrofickém prostoru transformují na extracelulární promastigoty. Procykličtí promastigoti (krátké formy s bičíkem kratším než tělo) se intenzivně množí a společně s rozpadem peritrofické matrix se přeměňují na dlouhé nektomonády, které se dlouhým bičíkem dokážou přichytit mezi mikrovily střevního epitelu. Tím pádem se ve střevě udrží i po defekaci nestrávených zbytků krve. Infekce se postupně přesouvá z abdominální části mesenteronu do thorakální části. V thorakálním mesenteronu převládají dělicí se krátké leptomonády, z nichž vznikají další dvě formy buněk parazita: přisedlé haptomonády, které se přichycují na chitinovou výstelku stomodeální valvy a malé, vysoce pohyblivé metacyklické formy s dlouhým bičíkem. Právě metacyklické formy parazita jsou pro obratlovce vysoce infekční. Přenos leishmanií do hostitele je usnadněn jednak enzymatickým narušením chitinové vrstvy stomodeální valvy chitinázou leishmanií (Rogers *et al.*, 2008) anebo přítomností gelovité zátky (tzv.

promastigote secretory gel, sekretovaný pravděpodobně leptomonádami) v thorakálním mesenteronu (Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002). Takto je mechanicky zkomplikováno sání a flebotom regurgituje zpět do hostitele část nasáté krve spolu s metacykly parazita. Tato infekční stadia jsou v hostitelském prostředí schopna invadovat do několika typů fagocytózy schopných buněk. Ta jsou pohlcena přímo makrofágy, nebo se do makrofágů dostanou zprostředkovaně přes neutrofilů. Buňky hostitelské imunity obvykle pohlcené patogeny zabíjejí, metacyklické formy leishmanií se však uvnitř leukocytů rychle transformují na amastigoty, kteří zde přežívají, množí se a čekají na nasátí dalším přenašečem (Sharma & Singh, 2009; Ramalho-Ortigao & Saraiva, 2010).



Obrázek 2-1: Životní cyklus parazita *Leishmania* sp.

Převzato a upraveno z <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis>

2.1.1 Typy leishmanióz z hlediska klinických příznaků

Podle klinického projevu rozlišujeme 3 základní typy leishmanióz: kožní, muko-kutánní a viscerální. Prvotní příznaky se objevují na kůži, a pokud se jejich lokalizace nezmění po celou dobu onemocnění, mluvíme o kožní leishmanióze. První známkou infekce je typicky malá erythema, která se objevuje po prepatentní periodě v místě pobodání hmyzem. V průběhu 2 týdnů až 6 měsíců se v místě bodnutí utváří léze, která se po čase spontánně vyhojí, to je charakteristické pro tzv. lokalizovanou kožní leishmaniózu (LCL). Délka vyhojení léze závisí na druhu parazita (viz tabulka 2-1) (Peters and Killick-Kendrick, 1987; Reithinger *et al.*, 2007).

Spontánní vyhojení obvykle vede k celoživotní imunitě vůči tomuto onemocnění, ovšem celoživotní imunita nemusí být omezena na stejný druh leishmanie. Po odeznění onemocnění zůstává často po lézi jizva, která v závislosti na velikosti a umístění může způsobovat trauma u postižených jedinců (Yanik *et al.*, 2004). Druhým typem kožní leishmaniózy je difuzní kožní leishmanióza (DCL) vyskytující se jen zřídka v částech Jižní Ameriky (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*), ale i v Etiopii a Keni (*L. aethiopica*). Objevuje se hlavně u lidí s oslabenou buněčnou imunitou. Pacientům se vytvářejí noduly s parazity (bez ulcerace) po celém těle, nejen v místě primární infekce. Ve srovnání s LCL je DCL obtížně léčitelná a noduly se nevyhojí spontánně (Peters & Killick-Kendrick, 1987; Reithinger *et al.*, 2007). Mezi nejdůležitější druhy působící kožní leishmaniózu řadíme *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* a *L. panamensis* (Ready, 2014), ale CL mohou vyvolat i druhy působící obvykle viscerální formu onemocnění jako *L. infantum* nebo *L. donovani* (Pearson & Sousa, 1996).

Druh parazita	Rozšíření	Klinické příznaky	Délka vyhojení léze
<i>L. major</i>	Starý svět	LCL	2 – 6 měsíců
<i>L. mexicana</i>	Nový svět	LCL, DCL	3 – 9 měsíců
<i>L. tropica</i>	Starý svět	LCL	6 – 15 měsíců
<i>L. braziliensis</i>	Nový svět	LCL, MCL	6 – 15 měsíců
<i>L. panamensis</i>	Nový svět	LCL, MCL	6 – 15 měsíců
<i>L. aethiopica</i>	Starý svět	LCL, DCL	6 – 15 měsíců

Tabulka 2-1: Druhy působící většinu případů kožní leishmaniózy

LCL = lokalizovaná forma kožní leishmaniózy, DCL = difuzní forma kožní leishmaniózy,

MCL = muko-kutánní forma leishmaniózy

(Převzato z Reithinger *et al.*, 2007)

Jestliže onemocnění nezůstane jen v kůži a infekce zasáhne i sliznici, jedná se o mukokutánní formu leishmaniózy (MCL), která se vyznačuje schopností parazita tvořit metastázy na sliznici a po těle se šíří lymfogenní nebo hematogenní cestou. Obvykle se projevuje ulcerací nosní sliznice a horního měkkého patra, která může vést až k perforaci sliznice a znetvoření obličeje. Ve zvláštních případech může parazit napadat i uši, rty, tváře, hltan a hrtan (závažná muko-kutánní leishmanióza = espundia). Tento typ onemocnění se nikdy nevyhojí spontánně, je velmi obtížně léčitelný, a pokud dojde k sekundární bakteriální infekci zasaženého místa,

může to být pro pacienta fatální (Marsden, 1986). Nejčastějším původcem MCL je jihoamerická *L. braziliensis* (Marsden, 1986; Jones *et al.*, 1987), dále tuto formu onemocnění může působit *L. panamensis* (Saravia *et al.*, 1985), *L. guyanensis* (Santrich *et al.*, 1990), *L. major* (Kharfi *et al.*, 2003), *L. tropica* (Morsy *et al.*, 1995), *L. infantum* (Aliaga *et al.*, 2003), *L. amazonensis* (Barral *et al.*, 1991) a *L. donovani* (El-Hassan *et al.*, 1995). Ve Starém světě se tato forma vyskytuje hlavně u pacientů se sníženou imunitou.

Nejnebezpečnější formou leishmaniózy je třetí typ, viscerální leishmanióza (VL), také známá jako kala-azar (t. j. v hindštině černá nemoc). Její nebezpečnost spočívá v tom, že invaduje do vnitřních orgánů. Inkubační doba je 2 týdny až 18 měsíců. Onemocnění často začíná kožní lézí a zvětšením spádových uzlin, během 2-8 měsíců se objevují zánětlivá ložiska ve vnitřních orgánech. Paraziti se množí v buňkách mononukleárního fagocytárního systému (MFS), nejčastěji v makrofázích, které jsou nejhojnější v játrech a slezině. V důsledku toho dochází ke zvětšení obou těchto orgánů (McGwire *et al.*, 2014). Leishmanie také napadají buňky kostní dřeně a to u pacientů vyvolává pancytopenii, která vede k imunosupresi a větší náchylnosti k ostatním infekcím (McGwire *et al.*, 2014). Viscerální leishmanióza patří mezi progresivní onemocnění s fatálními následky u 75-95 % neléčených pacientů (Ready, 2014). Mezi nejdůležitější původce VL patří *L. donovani* komplex včetně *L. infantum*. Vyjma cestovatelských nákaz se *L. donovani sensu stricto* vyskytuje pouze ve Starém světě. Často zde přerůstá v závažné epidemie. Děje se tak hlavně ve špatně přístupných a chudých oblastech, kde lidé trpí podvýživou a sníženou imunitou. V posledních letech jsou nejzávažnější epidemie zdokumentovány z afrického kontinentu, například na území Libo Kemkem v Etiopii (2005-2006), Wajir v Keni (2008) nebo na Horním Nilu v jižním Súdánu (2009). Nejhorší epidemie v historii proběhla v letech 1984-1994 v Súdánu. Zemřela při ní třetina celé populace obývající západ Horního Nilu (v některých vesnicích nepřežila ani polovina obyvatel). V roce 1997 vypukla epidemie znovu, ale vlivem sezónní migrace dělníků zasáhla i sousední země, Etiopii a Eritreu (WHO, 2015). *Leishmania infantum* původní v oblastech okolo Středozemního moře byla inrodukována i do Latinské Ameriky, kde se poslední dobou úspěšně šíří (Lukeš *et al.*, 2007; WHO, 2010; Alvar *et al.*, 2012). Po zdárné léčbě VL u pacientů infikovaných *L. donovani* se může objevit (i po několika letech) post-kala-azar dermální leishmanióza (PKDL). Jedná se o chronické onemocnění projevující se jako makulární, makulopapulární nebo nodulární kožní dermatitida, tvořící se v důsledku množení parazitů v kůži. Postihuje 10-20 % pacientů v Indii a až 60 % pacientů v Súdánu vyléčených z VL (Mondal *et al.*, 2011; Ramesh & Mukherjee, 1995).

Jaký typ leishmaniózy se u nakaženého jedince objeví je dáno mnoha faktory - zejména druhem a virulencí parazita a stavem imunitního systému hostitele a jeho genetickou výbavou. U celé řady živočichů je známo, že nedochází k žádnému projevu onemocnění, i když v jejich těle nacházíme infekční parazitická stádia. O takových jedincích říkáme, že mají asymptomatický (bezpříznakový) průběh onemocnění (Badaro *et al.*, 1986; Pearson & Sousa, 1996; Quinnell & Courtenay, 2009). Několik prospektivních studií prezentovalo poměr incidence asymptomatických infekcí způsobených *L. donovani* nebo *L. infantum* k incidenci klinických případů, jejich výsledky jsou 1 : 2,4 v Súdánu, 4 : 1 v Keni, 5,6 : 1 v Etiopii, 18 : 1 v Brazílii, 50 : 1 ve Španělsku, 4 : 1 v Bangladéši a 8,9 : 1 v Indii a Nepálu (shrnuje Singh *et al.*, 2014). Asymptomatictí jedinci s přetrvávajícími parazity v krvi nebo kůži hostitele mohou být významným zdrojem infekce pro přenašeče. Dokazuje to například matematický model založený na datech z indického subkontinentu, který potvrdil, že v přenosu *L. donovani* hrají důležitou roli právě asymptomatictí jedinci (Stauch *et al.*, 2011).

2.1.2 Typy leishmanióz z hlediska přenosu

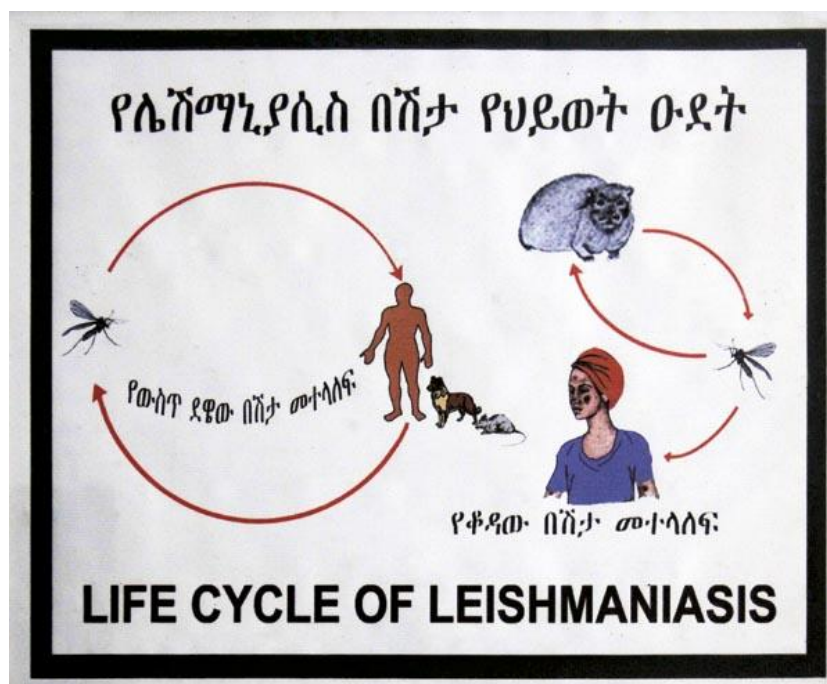
Z hlediska přenosu v endemických oblastech rozeznáváme dva základní typy onemocnění viz. obrázek 2-2 (Desjeux, 2004):

- Zoonotickou leishmaniózu, kde rezervoárovými hostiteli jsou divoká nebo domestikovaná zvířata.
- Antroponotickou leishmaniózu, kde onemocnění koluje pouze mezi lidmi.

Zoonózy můžeme dále rozdělit podle společenstev živočichů, kteří se na koloběhu onemocnění podílejí. Z tohoto hlediska rozeznáváme dva základní cykly – synantropní a sylvatický. Synantropní cyklus zahrnuje savčí hostitele leishmanií, kteří se vyskytují v přímé blízkosti lidských obydlí, například koloběh *L. infantum* mezi domácím psem, přenašečem a člověkem. Naopak, mluvíme-li o sylvatickém cyklu, leishmanie kolují za normálních podmínek mezi divokými savčími hostiteli, například *L. major* mezi přenašeči a pouštními a savanovými hlodavci (WHO, 2010).

Původci kožní leishmaniózy často v přírodě kolují jako zoonózy. Hlavní roli v koloběhu *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* či *L. lainsoni* hrají hlodavci, *L. aetiopica* je udržována mezi damany, *L. guyanensis* a *L. panamensis* mezi lenochody, *L. naiffi* mezi pásovci

(Ashford, 2000). Na rozdíl od ostatních leishmanií způsobujících CL se *L. tropica* většinou udržuje jako antroponóza. Existují však i zoonotická ohniska, např. v Izraeli, kde jsou rezervoáryými hostiteli damani, což bylo potvrzeno i xenodiagnostickými experimenty (Svobodová *et al.*, 2006).



Obrázek 2-2: Antroponóza versus zoonóza

Životní cyklus leishmanií. Vlevo je znázorněna VL (*L. donovani*), kde hlavním hostitelem je člověk (antroponóza) a vpravo CL (*L. aethiopica*), kde je hlavním hostitelem daman a člověk se nakazí náhodně (zoonóza).

Snímek © Jovana Sádlová, foceno v Leishmaniasis Research and Treatment Centre, Etiopie

Původci viscerální leishmaniózy kolují v přírodě různým způsobem. *Leishmania donovani* je původcem VL (kala-azar) v Indii, Nepálu, na Středním východě a ve východní Africe (Quinnell & Courtenay, 2009). Tato leishmanie funguje zřejmě na indickém subkontinentu jako antroponóza, zatímco ve východní Africe je cyklus alespoň zčásti zoonotický (Ready, 2014). Nasvědčují tomu např. velmi časté infekce hlídačů přírodního parku Dinder v Súdánu. Okolí tohoto parku je neobydlené a hlídači přicházejí do styku pouze s divokými zvířaty a s flebotomy, kteří na nich sají (Zijlstra *et al.*, 2003). Rezervoároví hostitelé z této oblasti zatím nejsou definitivně potvrzeni, ale původci VL byli opakovaně prokázáni například v hlodavcích (Kassahun *et al.*, 2015; Chance *et al.*, 1978; Blancq & Peters, 1986; Elnaiem *et al.*, 2001).

Odlišnost v typu přenosu mezi indickým subkontinentem a východní Afrikou by mohla být způsobena i rozdílným životním stylem obyvatel v jednotlivých oblastech. Ve východní Africe převažuje pastevecký způsob života spojený s častou migrací obyvatel. Lidé tak častěji přichází do styku s divokými zvířaty než v případě indických obyvatel (Ready, 2014). Na indickém subkontinentu se onemocnění přenáší antroponoticky a ohniska VL jsou dlouhodobě lokalizovaná ve vesnicích se stálým obyvatelstvem. Důležitou roli by tu v koloběhu *L. donovani* také mohli hrát pacienti s post-kala-azar dermální leishmaniózou (Singh *et al.*, 2006).

Leishmania infantum je původcem zoonotické VL v Asii, na Středním východě, v Evropě a Latinské Americe. V oblasti Středozemního moře jsou hlavními rezervoárovými hostiteli psi (Alvar *et al.*, 2004). Za další možné rezervoárové hostitele jsou považováni volně žijící lišky, šakali, vlci ale i zajíci, kočky a hlodavci (Gramiccia & Gradoni, 2005; Millán *et al.*, 2014).

2.2 Rezervoárový hostitel

2.2.1 Definice rezervoárového hostitele

Definice v Oxford English Dictionary říká (Martin, 2015): „Rezervoárový hostitel je sympatrická populace jednoho hostitelského druhu, která je chronicky zamořena původcem onemocnění a je schopna nakazit ostatní populace.“ Pouhá přítomnost infekce u nějakého savčího druhu nutně neznamená, že se dá tento druh považovat za rezervoárového hostitele (RH). Aby se jím stal, je nutné prokázat, že populace parazita je na daném druhu parazita závislá. Z toho vyplývá, že se mezi jedinci savčí populace musí parazit šířit dlouhodobě. Toto potvrzení vyžaduje důkladné ekologické, medicínské a epidemiologické studie (WHO, 2010). Při testování hostitele je důležité brát v úvahu i fakt, že synantropní nebo sylvatické cykly mohou běžet na daném území souběžně a mohou tak zahrnovat více rezervoárových hostitelů (Quinnell & Courtenay, 2009).

Obecně platí, že prohlášení savčího druhu za rezervoárového hostitele je nutno založit na terénních i laboratorních studiích různého charakteru. Základní kritéria, podle kterých lze objektivně posoudit zařazení druhu mezi rezervoáry onemocnění (Quinnell & Courtenay, 2009; WHO, 2010; Haydon *et al.*, 2002; Ashford, 1996), jsou následující:

- RH (rezervoárový hostitel) se musí hojně vyskytovat v dané endemické oblasti.

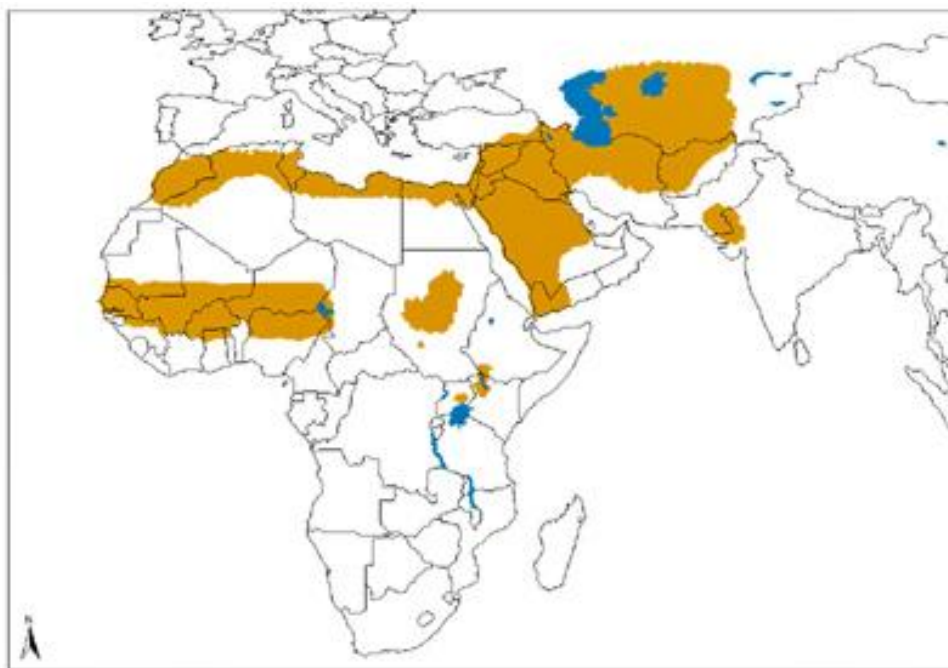
- RH musí být dostatečně dlouhověký, aby v něm parazit přežil období, kdy přenašeči nejsou přítomni z důvodu sezonních cyklů.
- RH musí být v kontaktu s flebotomy a musí pro ně představovat významný zdroj potravy.
- Podíl jedinců, kteří jsou za svůj život nakaženi, je významný, často překročí i 20 %. Prevalence se však může značně lišit v závislosti na ročním období.
- Průběh onemocnění u RH by měl být chronický a infekce by měla být v ideálním případě málo patogenní, aby parazit přežíval v RH co nejdéle a hostitel byl pro přenašeče dlouho infekční.
- Parazitická stádia by měla být přítomna v kůži či v krvi v dostatečném množství, aby se co nejdříve dostala při sání do těla přenašeče.

V oblastech, kde existuje více hostitelských druhů zodpovědných za přenos infekce, je možné z epidemiologického hlediska tyto savce rozdělit do 3 skupin rezervoárových hostitelů: primární, sekundární a náhodný hostitel. Aby populace parazita přežívala a úspěšně se přenášela, musí být její reprodukční rychlost ($R_0 \geq 1$) (Anderson *et al.*, 1992). Primárním RH se označuje savčí populace, ve které se populace parazita množí a přenáší na daném území i za nepřítomnosti dalších hostitelů. Sekundární RH je schopný infekci přenést, ale populace parazita bez přítomnosti primárního RH se sníží pod její breakpoint (příliš nízká denzita). Populace může ještě nějakou dobu přežívat, ale už se nebude moci reprodukovat ($R_0 < 1$). Náhodný hostitel se může infikovat, ale infekci dál nepřenáší, proto nemá žádný vliv na koloběh onemocnění na daném území ($R_0 = 0$). Z toho vyplývá, že je možné potlačit přenos parazita pomocí léčby nebo eliminace primárních RH. Boj proti sekundárním RH může vést ke snížení reprodukční rychlosti, ale nemůže docílit eradikace onemocnění. Boj proti náhodným hostitelům nebude mít žádný vliv na udržení populace parazita na daném území (Haydon *et al.*, 2002).

Rozlišení primárního a sekundárního RH je velmi obtížné. Pokud populace parazita bude přežívat a množit se i v oblasti, kde se vyskytuje pouze jeden druh hostitele a přenašeč, můžeme tento druh označit za primárního RH. Můžeme ho tak označit i v případě, že eliminace onemocnění u jedinců tohoto druhu vede k zastavení přenosu infekce (Quinnell & Courtenay, 2009).

2.2.2 Role hlodavců jako rezervoárových hostitelů *Leishmania major*

Leishmania major je původcem kožní leishmaniózy (CL), která je rozšířena v mnoha státech Starého světa (obrázek 2-3). Nejčastějšími vektory jsou *P. duboscqi* v subsaharské Africe, *P. saheli* v Indii a *P. papatasi* v ostatních regionech (Killick-Kendrick, 1999).



Obrázek 2-3: Mapa rozšíření *L. major* ve Starém světě

Žlutě – kožní forma, modře – muko-kutánní forma

(převzato z http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html)

Lidé nakaženi bodnutím infekčního přenašeče jsou většinou pouze náhodnými hostiteli, kterým se v místě sání vytváří kožní léze, ta se po čase spontánně vyhojí. Kožní leishmanióza koluje v přírodě jako zoonóza, hlavní roli v tomto cyklu hrají pouštní a savanové druhy hlodavců z endemických oblastí (Gramiccia and Gradoni, 2005; Ashford, 1996) vypsané v tabulce 2-2. Nejhojnějšími savci v těchto biotopech jsou hlodavci patřící do podčeledi Gerbillinae (pískomilové). Jedná se většinou o býložravce žijící často v ruderním prostředí v blízkosti lidských obydlí. Právě pískomilové jsou považováni za primární rezervoárové hostitele v oblasti severní Afriky, centrální Asie, severního Afganistánu a Íránu (Střelková, 1996; Dubrovsky, 1979; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 1996).

Druh hlodavce	Český název	Oblast výskytu infikovaných jedinců druhu
<i>Xerus rutilus</i>	veverka šilu	Keňa
<i>Gerbillus pyramidum</i>	pískomil egyptský	Egypt, Sinajský poloostrov
<i>Tatera gambiana</i>	pískomil štětkoocasý	Senegal
<i>Tatera indica</i>	pískomil indický	Írán
<i>Tatera robusta</i>	pískomil větší	Senegal, Etiopie, Súdán
<i>Taterillus emini</i>	pískomil malý	subsaharská Afrika
<i>Meriones crassus</i>	pískomil hedvábný	severní Afrika, Střední východ
<i>Meriones libycus</i>	pískomil rudoocasý	Střední Asie, Arabský poloostrov, Írán
<i>Meriones hurrianae</i>	pískomil pouštní	Indie, Írán
<i>Meriones shawi</i>	pískomil Shawův	jižní Maroko, Tunis
<i>Psammomys obesus</i>	pískomil tlustý	severní Afrika, Střední východ
<i>Cricetomys gambianus</i>	krysa obrovská	západní Afrika
<i>Arvicanthis niloticus</i>	myš nilská	Súdán, Etiopie, Senegal
<i>Aethomys kaiseri</i>	krysa Kaiserova	Etiopie
<i>Mastomys natalensis</i>	krysa mnohobradavková	Senegal, Keňa
<i>Mastomys erythroleucus</i>	krysa guinejská	Senegal, Keňa
<i>Nesokia indica</i>	krysa morová	subsaharská Afrika, Írán
<i>Rhombomys opimus</i>	pískomil velký	Střední Asie, Mongolsko, Čína

Tabulka 2-2: Přehled hlodavců přirozeně infikovaných *Leishmania major*

(Sestaveno na základě Dubrovsky, 1979; Rassi *et al.*, 2006; Moemenbellah-Fard & Kalantari, 2003; Sharma *et al.*, 1973; Kassiri *et al.*, 2011; Fichet-Calvet *et al.*, 2003; Belazzoug, 1983; Sibae *et al.*, 1993; Rioux *et al.*, 1982; Ghawar *et al.*, 2011; Ashford, 1996; Ashford, 2000; Dedet *et al.*, 1979; Githure *et al.*, 1986; Střelková, 1996; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 1996)

Velice dobře je popsán zoonotický cyklus *Rhombomys opimus* – *P. papatasi* – *L. major*, který se vyskytuje na velkém území nížiny Turán (západní a jižní Kazachstán, Střední Asie a přilehlé části Afganistánu a Íránu), v Mongolsku a asi i v některých provinciích Číny.

Právě v nížině Turán vědecká skupina profesora Dubrovského odchytila infikované jedince *R. opimus* na více než 200 místech (Dubrovsky, 1979). Tito hlodavci vykazovali daleko vyšší míru infekce než jiné druhy odchycených savců.

Dalším důležitým rezervoárovým hostitelem *L. major* je *Meriones libycus* žijící v endemických oblastech na Arabském poloostrově, v Íránu a Střední Asii. V Íránu byla tato leishmanie z druhu *M. libycus* poprvé izolována roku 1996 ve vesnici Matinabad. Pískomil rudoocasý je dnes považován za primárního RH v jižních částech země. Dokládají to i studie z posledních let, kdy za pomoci mikroskopie, kultivace a nestedPCR bylo určeno 4,6 % přirozeně nakažených

jedinců *M. libycus* z 65 odchycených v okolí města Neiriz (Rassi *et al.*, 2006) a 3,4 % z 56 odchycených v provincii Fárs (Moemenbellah-Fard & Kalantari, 2003).

Mezi další důležité druhy pískomilů a ostatních hlodavců zodpovědných za koloběh kožní leishmaniózy v přírodě patří *Meriones hurrianae* v Indii a Íránu (Sharma *et al.*, 1973; Kassiri *et al.*, 2011), *Psammomys obesus* a *Meriones crassus* v severní Africe a na Středním východě (Fichet-Calvet *et al.*, 2003; Belazzoug, 1983; Sibae *et al.*, 1993) či *Meriones shawi* v jižním Maroku a Tunisu (Rioux *et al.*, 1982; Ghawar *et al.*, 2011).

Rezervoároví hostitelé lidských leishmanióz v subsaharské Africe zatím nejsou známi, ale původci kožní a viscerální leishmaniózy (*L. major* a *L. donovani*) zde byli opakovaně prokázáni nejméně v šesti druzích hlodavců (Ashford, 1996). Nejčastěji byla *L. major* izolována z jedinců rodu *Arvicanthis* (zejména druhu *A. niloticus*), ale je známo, že u těchto hlodavců dochází často k rapidním výkyvům velikosti populace. V období jejich nízké abundance by tedy roli RH v této oblasti mohly hrát další druhy hlodavců. Uvažuje se hlavně o myšovitých hlodavcích rodu *Mastomys* (Ashford, 1996; Ashford, 2000). *Leishmania major* byla vyizolována ze tkání jedinců *Mastomys natalensis* a *Mastomys erythroleucus* odchycených na území Senegalu a Keni (Dedet *et al.*, 1979; Githure *et al.*, 1986). Náchylnost *M. natalensis* byla experimentálně potvrzena na šesti jedincích (albinotický kmen z Justus Liebig University, Německo) intradermálně nakažených promastigoty z kultury *L. major* (MRHO/SU/59/Neal P). V místě inokulace se objevila neulcerující léze, která zde přetrvala více než 30 týdnů od infekce (Nolan & Farrell, 1987). Potvrzení role *M. natalensis* v koloběhu kožní leishmaniózy však vyžaduje další laboratorní experimenty i terénní pozorování.

Další druhy podezřelé z přenosu *L. major* v subsaharské Africe jsou *Tatera gambiana*, *Tatera robusta*, *Taterillus emini* a *Nesokia sp.* hlavně v oblasti Senegalu, Keni, Etiopie, Súdánu a Nigerie (Chance *et al.*, 1978; Githure *et al.*, 1986; Mutinga and Ngoka, 1983; Gebre-Michael *et al.*, 1993; Dedet *et al.*, 1979).

Jeden z hlavních problémů kontroly a pochopení kožní leishmaniózy je detekce původců onemocnění v rezervoárových hostitelích. Infekce *L. major* je v některých oblastech doprovázena pro člověka nepatogenními druhy *L. turanica* a *L. gerbilli*, které nejsou rozeznatelné mikroskopicky (Střelková, 1996). Některé techniky, kultivace a přímé vyšetření, používané pro diagnostiku nerozlišují jednotlivé druhy leishmanií. Vhodným nástrojem se ukazuje nested-PCR, která se zdá být rychlou, citlivou a specifickou alternativou (Akhavan *et al.*, 2010).

2.2.3 Imunitní odpověď savčího hostitele proti leishmaniím

Leishmanie jsou do savčího hostitele přenášeny flebotomy během sání. Do kůže hostitele se tak dostávají jak promastigoti, tak sliny flebotomů a produkty parazita, např. PSG. Obě složky - parazitární i slinné komponenty přenašeče - hrají důležitou roli v modulaci imunitní odpovědi hostitele proti leishmanióze (Sacks & Kamhawi, 2001).

Sliny flebotomů podporují přežívání leishmanií v kůži hostitele a zvyšují jejich virulenci (enhancing efekt). Dokazuje to již studie Titus & Ribeiro (1988), ve které k inokulu *L. major* byl přidán lyzát slinných žláz. Léze u pokusné skupiny myší se mnohonásobně zvětšily oproti kontrolní skupině (infikováni *L. major* bez přidání slinných žláz). Tento efekt byl zřejmý u obou kmenů myší (BALB/c a CBA) použitých v pokusu. Mezi další studie potvrzující enhancing efekt slinných žláz patří i práce Theodos *et al.* (1991) nebo Warburg *et al.* (1994) studující na myším modelu tento efekt na dvojicích:

- *Lu. longipalpis* – *L. mexicana amazonensis*
- *P. papatasi* – *L. major*
- *Lu. longipalpis* – *L. major*
- *Lu. longipalpis* – *L. donovani*.

Mezi mechanismy, kterými by mohly sliny flebotomů přispívat k propuknutí a vývoji onemocnění v hostiteli, patří také inhibice INF- γ (který zprostředkovává destrukci leishmanií pomocí aktivace makrofágů), kterým inhibují produkci NO (Hall & Titus, 1995). Sliny flebotomů také snižují schopnost dendritických buněk prezentovat leishmaniový antigen, což má za následek snížení proliferační odpovědi T-lymfocytů (Theodos & Titus, 1993). V neposlední řadě se zdá, že sliny flebotomů mají chemotaktický vliv pro makrofágy, tím pádem mají leishmanie větší šanci rychle osídlit tyto buňky (Zer *et al.*, 2001). Výsledek enhancing efektu slin je polarizace imunitní odpovědi hostitele směrem k Th2. Produkce cytokinů INF- γ a IL-12 (Th1 imunitní odpověď) a iNOS byla účinkem slinných žláz inhibována, zatímco IL-4 (Th2 imunitní odpověď) byl produkován ve zvýšeném množství (Mbow *et al.*, 1998).

Sliny flebotomů však nemusí vždy podporovat přežívání leishmanií v hostiteli. To ukazuje studie Belkaid *et al.* (1998), která ukázala, že pokud jsou myši vystaveny slinám flebotomů před nakažením *L. major*, enhancing efekt slin pro leishmanie se vyruší. Tento výsledek byl zaznamenán u obou použitých kmenů myší (BALB/c a C57Bl/6). Dokonce má preimunizace jedinců pomocí slin flebotomů protektivní účinek proti kožní leishmanióze (Kamhawi *et al.*,

2000). Tato protektivní imunitní odpověď je však druhově specifická (Thiakaki *et al.*, 2005). Studie Ahmed *et al.* (2010) ukázala rozdílné výsledky preimunizovaných myší slinami flebotomů na rozvoj kožní leishmaniózy (*L. major*). Pokud byly myši preimunizované slinami flebotomů chovaných v laboratorní kolonii, měly sliny protektivní účinek proti rozvoji onemocnění, ale pokud byly myši imunizované slinami flebotomů odchycených v přírodě, protektivní účinek slin nebyl prokázán.

Nejdůležitější produkt parazita injikovaný spolu s promastigoty do hostitele je PSG (promastigote secretory gel). Promastigoti leishmanií z něj vytváří gelovitou zátku v oblasti stomodeální valvy v přední části střeva flebotoma (Stierhof *et al.*, 1999), která má za následek problémy se sáním. Flebotom častěji mění místo sání a během sání často regurgituje část nasáté krve i obsahu střeva včetně leishmanií zpět do hostitele (Rogers *et al.*, 2002). Regurgitovaný PSG ovlivňuje průběh kožní leishmaniózy pomocí dvou mechanismů. První z nich je schopnost lákat makrofágy do místa sání přenašeče (Bates, 2007) a druhým mechanismem je, že PSG moduluje aktivaci makrofágů, což má za následek zvýšení syntézy polyaminů důležitých pro růst eukaryotických buněk. Paraziti využívají polyaminů uvnitř fagocytujících buněk pro svůj růst a množení (Rogers *et al.*, 2009).

Další důležitou součástí inokula, kterou infikovaní flebotomové vnášejí do hostitele, jsou sekretované exosomy. Tyto váčky o velikosti 40-100 nm, které promastigotní stádia sekretují do lumenu střeva flebotomů, obsahují například proteázu GP63 a mají imunomodulační účinky (Silverman *et al.*, 2010; Silverman & Reiner, 2012; Hassani *et al.*, 2014). Atayde *et al.* (2015) prokázali *in vivo*, že exosomy leishmanií jsou virulenčním faktorem, který má vliv na rozvoj infekce v hostiteli.

Poslední a nejdůležitější roli v modulaci imunitního systému hrají sami metacykličtí promastigoti inokulovaní do savčího hostitele. Hned po injekci do kůže jsou vystaveni imunitnímu systému. Nejčastěji jsou leishmanie fagocytovány přímo makrofágy (hlavní hostitelská buňka leishmanií) nebo zprostředkovaně přes neutrofile (hypotéza Trojského koně) (Laskay *et al.*, 2003). Leishmanie jsou pohlceny neutrofilem a uvnitř přežívají ve fagosomu pomocí mobilizace azurofilních granulí (Mollinedo *et al.*, 2010). Leishmanie jsou schopné prodloužit svůj pobyt v neutrofilech tím, že oddálí jejich apoptózu. Ale nakonec k apoptóze stejně dojde a neutrofil je pohlcen makrofágem (Peters & Sacks, 2009). Tento způsob vstupu do makrofágu je pro pa-

razita velice výhodný, protože neaktivuje makrofág k mikrobicidní odpovědi, což umožňuje tichý vstup *L. major* do makrofágu. Tento mechanismus úniku by mohl vysvětlit bezpříznakovou časnou fázi onemocnění (Laskay *et al.*, 2003; Peters & Sacks, 2009).

O stavu rezistence či vnímavosti ke kožní leishmanióze rozhodují pomocné T-lymfocyty (Th buněčná linie exprimující na svém povrchu koreceptor CD4), které jsou detekovatelné v mízních uzlinách myši již 16 hodin po infekci (Ehrchen *et al.*, 2008). Tyto Th-lymfocyty se vyskytují v těle ve dvou základních subpopulacích: Th1 subpopulace je prostředníkem při aktivaci makrofágů a Th2 subpopulace aktivuje B-lymfocyty. Příslušnost k jedné ze subpopulací je dána typem cytokinů, které produkují. Th1 buňky produkují především IL-2, IFN- γ a TNF- α naopak Th2 buňky produkují především IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 (Scott, 1989).

Klasický model infekce *L. major*, spontánně se hojící léze, je spojena s polarizací imunity k Th1 odpovědi. Tento model se objevuje u rezistentních kmenů myši, jako např. C57Bl/6, u kterých je produkován IFN- γ (Heinzel *et al.*, 1989). IFN- γ je hlavním aktivátorem makrofágů a jeho produkci zvyšují další molekuly, jako jsou TNF- α , LPS (lipopolysacharid) a muramyl dipeptid (Drapier & Wietzerbin, 1988). Takto aktivované makrofágy ničí intracelulární parazity pomocí oxidu dusnatého (NO), který se generuje z L-argininu pomocí iNOS (NO-syntázy) (Wei *et al.*, 1995). Pro rozvoj Th1 polarizace imunitní odpovědi je důležitý i IL-12 (Sypek *et al.*, 1993; Vieira *et al.*, 1994), vylučují ho například dendritické buňky při pohlcování amastigotů *L. major* (Nigg *et al.*, 2007).

U myši kmene BALB/c *L. major* vyvolává progresivní systémové onemocnění. Tento projev onemocnění je způsoben polarizací imunity směrem k Th2 odpovědi, při které se produkují IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 (Heinzel *et al.*, 1989). Vývoj Th2 je přičítán časně produkci IL-4 pomocí V4V8CD4⁺T-lymfocytů. Tyto buňky rozpoznávají antigen LACK (leishmaniový homolog receptorů pro aktivované C-kinázy). Potvrzuje to i studie Julia *et al.* (1996), která ukazuje, že u myši tolerantních k LACK (pomocí transgenní exprese antigenu v brzlíku) se snížila Th2 odpověď a došlo k vyhojení lézí. Kromě toho i V4-deficientní BALB/c se vyznačují silnější odpovědí Th1 než geneticky nepozměněné BALB/c a jejich imunita je schopná ovlivnit replikaci parazita (Himmelrich *et al.*, 2014). Nejen IL-4 je důležitý pro vytvoření Th2 odpovědi, ale i imunomodulační IL-10. Tento cytokin je produkován mnoha typy buněk včetně B-lymfocytů, makrofágy, dendritickými buňkami i Treg-lymfocyty (regulační linie). Poslední studie ukázaly, že právě regulační buňky CD4⁺CD25⁺FOXP3 (natural Treg buňky tvořící se v brzlíku) jsou hlavní v produkci IL-10 (Anderson *et al.*, 2007). Tyto buňky se hromadí v místě inokulace, kde používají jak IL10-

dependentní tak IL-10-independentní mechanismy, kterými přispívají k přežití leishmanií (Belkaid *et al.*, 2002). Rovnováha mezi Treg-lymfocyty a efektorovými T-lymfocyty je rozhodující pro odolnost vůči reinfekci (Belkaid *et al.*, 2001).

Úspěšné přežívání leishmanií v nehostinných podmínkách hostitelského těla je umožněno také přítomností specifických glykokonjugátů na povrchu parazita. Tyto molekuly jsou důležité pro vývoj v hmyzím přenašeči (Sacks *et al.*, 1994) i v savčím hostiteli (McConville & Ferguson, 1993). Na povrchu leishmanií převažují dva typy molekul: lipofosfoglykany (LPG) a nízkomolekulární glykoinositol-fosfolipidy (GIPLs) (Ropert & Gazzinelli, 2000; Liew *et al.*, 1997).

LPG je produkován především promastigoty a slouží jako ligand pro makrofágy (McConville & Blackwell, 1991), dokáže inhibovat oxidativní vzplanutí (regulace exprese NADPH oxidázy) (Proudfoot & O'Donnell, 1995) a inhibuje fagosomální maturaci (fúze fagosomu s lyzozomem) (Holm *et al.*, 2001). Zároveň chrání leishmanie před lytickou degradací komplementem (Puentes *et al.*, 1990). GIPLs jsou exprimovány na povrchu promastigotů i amastigotů. Je prokázáno, že některé GIPLs jsou prekurzory pro LPG (McConville & Blackwell, 1991). Tato molekula pomáhá leishmaniím přežít v hostitelském prostředí pomocí inhibice produkce NO (Proudfoot & O'Donnell, 1995). Oba typy glykokonjugátů tak dovolují parazitům ukrýt se před hostitelskou imunitou a šířit se dál.

2.3 Xenodiagnostika

2.3.1 Charakteristika xenodiagnostiky a její typy

Pojem xenodiagnostika poprvé použil francouzský badatel Emilé Brumpt roku 1914 v souvislosti s Chagasovou nemocí. Xenodiagnostika (XD) je vyšetřovací metoda používající přenašeče jako biologické médium pro detekci parazita v krvi vyšetřovaného savčího jedince (Schenone, 1999). Přenašečem je míněn nenakažený členovec chovaný v laboratoři, při detekci Chagasovy nemoci se jedná o nymfy krevsajících ploštic, jedná-li se o detekci leishmaniózy, používají se dospělé samice *Phlebotomus* nebo *Lutzomyia* (Vexenat *et al.*, 1994; Schenone, 1999; Guarga *et al.*, 2000).

Známe dva základní typy xenodiagnostiky, přímou a nepřímou. Hlavním rozdílem mezi těmito dvěma typy je způsob odběru krve. Při přímé XD se vhodní přenašeči přikládají přímo na kůži vyšetřovaného jedince, kde sají krev. Při nepřímé XD je vyšetřovanému jedinci odebráno

určité množství krve (u člověka 10 ml), ta se heparinizuje a udržuje při -4°C do doby zpracování. Touto krví se krmí nenakažení přenašeči. Sání probíhá přes membránu, kterou je nejčastěji kůže kuřat, která se natáhne na krmítko nebo nádobku s krví (Alvar *et al.*, 1997; Volf & Volfová, 2011).

Nepřímá xenodiagnostická metoda byla zavedena kvůli vedlejším účinkům přímé XD v podobě kožní alergické reakce, která se může objevit po bodnutí přenašečem (Mott *et al.*, 1980). Mezi výhody nepřímé XD patří i možnost použití krve pro vyšetření *post mortem* (Schenone, 1999), nebo že se odebraná krev může použít s odstupem času bez snížení účinnosti metody (Castro *et al.*, 2004). Jedna z velkých nevýhod je, že se v odebrané periferní krvi nemusí nacházet dostatečné množství parazitů, aby došlo k infekci přenašeče. Proto se stále častěji používá přímé xenodiagnostické vyšetření i s rizikem, že dojde ke kožní alergické reakci. Nepřímá XD se neukázala ani jako dobrý ukazatel průběhu onemocnění. Přímá XD se zdá být citlivější metodou v porovnání s nepřímou XD, jak je patrné i z tabulky 2-3.

	IFAT	Přímá XD	Nepřímá XD
Asymptomatictí psi	1/560	30,6 % infekčních přenašečů	3,8 % infekčních přenašečů
Oligosymptomatictí psi	1/920	49,6 % infekčních přenašečů	2,8 % infekčních přenašečů
Polysymptomatictí psi	1/1376	46,5 % infekčních přenašečů	13,3 % infekčních přenašečů

Tabulka 2-3: Srovnání přímé a nepřímé XD
 IFAT = nepřímý imunofluorescenční protilátkový test
 (Převzato a upraveno z Guarga *et al.*, 2000)

2.3.2 Příklady využití xenodiagnostiky v minulosti a dnes

V minulosti se xenodiagnostika používala jako hlavní diagnostická metoda pro průkaz parazita v krvi pacienta, nejčastěji v souvislosti s Chagasovou nemocí, kde je nízké procento zachytu promastigotních stádií *T. cruzi* mikroskopicky. Největšího významu dosahovala ve 30. až 90. letech minulého století, kdy se touto problematikou zabývalo velké množství vědeckých skupin. Vycházely studie zaměřené na několik důležitých aspektů, které měly zlepšit a hlavně zefektivnit XD metodu. Patří mezi ně studie zabývající se počtem nymf krevsajících ploštic na jedno XD vyšetření, počtem a délkou vyšetření a intervalem mezi nimi, množstvím odebrané krve při nepřímé XD, hledáním nejvhodnějšího druhu přenašeče nebo studie srovnávající druh XD vyšetření (Bronfen *et al.*, 1984; Dias, 1940; Perlowagora-Szumlewicz & Muller, 1982;

Schenone, 1999). Cílem bylo získat dostatečně průkazný výsledek a zároveň ochránit pacienty před nadměrně stresovou situací.

V posledních letech byla xenodiagnostika jako diagnostická metoda zcela nahrazena novějšími molekulárními metodami, např. polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) (Mullis, 1990). V dnešní době si xenodiagnostika našla své nové místo ve výzkumných týmech. Ukázala se být velmi vhodnou metodou pro testování infekčnosti hostitele pro přenašeče. Tato metoda se tak jeví jako dobrý nástroj pro testování nových rezervoárových hostitelů a pro sledování role různých živočichů v koloběhu onemocnění, která jsou přenášena členovci. Xenodiagnostika se často používá při studiu leishmanióz u domácích i volně žijících zvířat, která jsou podezřelá z přenosu různých druhů leishmanióz v endemických oblastech. Tabulka 2-4 ukazuje výčet hostitelů, kteří byli testováni pomocí xenodiagnostické metody. Nejčastější použití xenodiagnostiky bylo při studiu rezervoárových hostitelů *L. infantum*.

Při xenodiagnostickém vyšetření (při studiu leishmanióz) se obvykle používají druhy přenašečů, které se vyskytují v endemických oblastech, odkud pocházejí savčí hostitelé. Vybírají se takové druhy, které lze chovat v laboratoři a které jsou náchylné pro daný druh leishmanie. Například pro druh *L. infantum* vyskytující se ve Středomoří se používají nejčastěji přenašeči druhu *Phlebotomus perniciosus*, který je v této oblasti hlavním vektorem (Bongiorno *et al.*, 2013; Guarga *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 1994; WHO, 2010). Naopak studie testující jihoamerické hostitele používají druh *Lutzomyia longipalpis* (Laurenti *et al.*, 2013; Vexenat *et al.*, 1994). Při testování izraelských rezervoárových hostitelů (damanů) *L. tropica* byl jako přenašeč použit *Phlebotomus arabicus*, typický druh flebotoma v daném ohnisku (Svobodová *et al.*, 2006) oproti jinak používanému *Phlebotomus sergenti* (Svobodová *et al.*, 2003). Při testování hlodavců nakažených *L. donovani* byli tito hlodavci vystaveni sání *Phlebotomus orientalis*, který je hlavním vektorem v severní Etiopii a Súdánu (Ready, 2013; Sádlová *et al.*, 2015). V minulých letech byl v naší laboratoři sledován vývoj infekce leishmanií z komplexu *L. enrietti* LV90 v morčatech (*Cavia porcellus*) a zlatých křečcích (*Mesocricetus auratus*) a byla testována jejich infektivita pro přenašeče. U tohoto druhu leishmanií, vyizolovaných z morčat v Brazílii a z klokanů v Austrálii, však není znám přenašeč. Uvažuje se jak o flebotomech (Diptera: *Phlebotomine*) tak o tiplících (Diptera: *Ceratopogonidae*). Z toho důvodu byli nakaženi jedinci morčat a křečků vystaveni sání *Lutzomyia longipalpis*, *Culicoides sonorensis* a *C. nubilosus* (Šeblová *et al.*, 2015).

<i>Savčí hostitel</i>	<i>Druh leishmanie</i>	<i>Použitý přenašeč</i>	<i>Země původu H</i>	<i>Infektivita hostitele</i>	<i>Reference</i>
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	11/44 symptomatických H 0/137 asymptomatických H	(Costa et al. 2000)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	4/14 symptomatických H	(Deane & Deane 1955)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	2/6 symptomatických H	(Sherlock 1996)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko	6/6 symptomatických H	(Molina et al. 1999)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	4/4 pacientů s PKDL 5/5 s kala azar	(Addy & Nandy 1992) (Mukhopadhyay & Mishra 1991)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	4/4 pacientů s PKDL	(Napier et al. 1933)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	7/7 pacientů s kala azar	(Shortt 1931)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	1/- pacient s kala azar	(Napier & Smith 1927)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	3/6 pacientů s kala azar	Christopher 1924
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	1/- pacient s kala azar	(Shortt et al. 1927)
<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Indie	1/- pacient s kala azar	(Smith et al. 1940)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko	5/9 asymptomatických H 4/6 oligosymptomatických H 7/7 symptomatických H	(Molina et al. 1994)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	6/9 symptomatických H 0/5 asymptomatických H	(Verçosa et al. 2008)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko	10/10 symptomatických H	(Guarga et al. 2000a)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	10/25 symptomatických H	(Ribeiro et al. 2008)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	5/6 symptomatických H 2/6 asymptomatických H 1/6 oligosymptomatických H	(Michalsky et al. 2007)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	26/48 symptomatických H	(Amorim et al. 2011)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	0/24 asymptomatických H 18/42 symptomatických H	(Courtenay et al. 2002)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	3/15 asymptomatických H 7/20 symptomatických H	(M. R. A. Soares et al. 2011)
<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	16/24 symptomatických H 13/14 asymptomatických H	(M. D. Laurenti et al. 2013)

<i>Canis lupus f. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Kolumbie	0/5 asymptomatických H 2/7 oligosymptomatických H 4/8 symptomatických H	(B. L. Travi <i>et al.</i> 2001)
<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	0/1 symptomatický H 0/20 asymptomatický H	(Courtenay <i>et al.</i> 2002)
<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	1/1 symptomatický H 0/1 asymptomatický H	(Gomes <i>et al.</i> 2007)
<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	1/1 symptomatický H	(Deane & Deane 1955)
<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	1/1 asymptomatický H	(Laison <i>et al.</i> 1990)
<i>Felis catus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Itálie	1/1 symptomatický H	(Maroli <i>et al.</i> 2007)
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	1/- asymptomatický H	(Sherlock 1996)
<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Kolumbie	2/4 asymptomatický H 1/1 symptomatický H	(Travi <i>et al.</i> 1998)
<i>Rattus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Itálie	1/3 asymptomatický H	(Gradoni & Pozio 1983)
<i>Rattus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perfliewi</i>	Itálie	1/1 asymptomatický H	(Pozio <i>et al.</i> 1985)
<i>Rattus</i>	<i>L. tropica</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i> (narození v ČR)	Turecko (narození v ČR)	8/10 asymptomatických H	(Svobodová <i>et al.</i> 2003)
<i>Proechimys semispinosus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Kolumbie	0/6 asymptomatický H	(Travi <i>et al.</i> 2002)
<i>Procaravia capensis</i>	<i>L. tropica</i>	<i>Phlebotomus arabicus</i>	Izrael (narození v ČR)	1/1 symptomatický H ½ asymptomatický H	(Svobodová <i>et al.</i> 2006)
<i>Lepus granatensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko	4/7 asymptomatický H	(Molina <i>et al.</i> 2012)
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko	5/10 asymptomatický H	(Jiménez <i>et al.</i> 2014)
<i>Equus asinus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie	0/2 asymptomatický H	(Cerqueira <i>et al.</i> 1937)

Tabulka 2-4: Přehled hostitelů leishmaniózy testovaných pomocí xenodiagnostiky

(převzato a upraveno z Quinell and Courtenay, 2009)

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Složení použitých roztoků

- Fyziologický roztok
150 mM NaCl
- Anestetika
2% xylazin (Rometar; Spofa) + 10% ketamin (Narketan; Vétoquinol) + sterilní fyziologický roztok (150 mM NaCl)
intraperitoneální dávkování (150 mg/kg xylazinu + 15 mg/kg ketaminu u BALB/c myši, 10 mg ketaminu/100 g + 2 mg xylazinu/100 g u *Mastomys natalensis*)
- Ředící roztok (počítání leishmanií v Burkerově komůrce)
0,85% NaCl + 1% formaldehyd (CH₂O)
- Tekuté médium pro kultivaci *L. major*
médium M199 (Sigma) + 20% fetální kravské sérum (Gibco, kat. č. F9665)
+ 1% BME vitamíny (Sigma, kat. č. B6891) + 0,8% amikin (Brystol- Myers Squibb, kat. č. 1038585A2) + 2% sterilní moč
- Krevní agar pro kultivaci *L. major* ze tkání
pevná složka: Bacto Neopeptone 2g (BD), Bacto Agar (BD) 2g, NaCl 0,6g doplněno do 100ml H₂O.
sterilizováno autoklávem 20min, po zchlazení přidáno 25ml sterilní defibrilované králičí krve (Bioveta)
Tekutá složka (Over-lay): totéž složení bez agaru, sterilizováno autoklávem
- Navazovací roztok (karbonát-bikarbonát)
20 mM Na₂CO₃ - NaHCO₃; pH 9,0- 9,5
- Promývací roztok
PBS + 0,05% Tween
- PBS
150 mM NaCl + 3 mM KCl + 8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O + 1 mM K₂HPO₄
pH 7,2

- Substrátový roztok

Mcllwein fosfát-citrát (pH 5,50) + 11 M Na₂HPO₄ × 12 H₂O + 0,5 M kyselina citronová

Těsně před použitím přidat 5M OPD (orthofenylendiamin) a 0,03% H₂O₂

3.2 Chov hlodavců

Při pokusech v rámci diplomové práce byly použity dva druhy hlodavců: myši inbredního kmene BALB/c a hlodavci *Mastomys natalensis*.

Mastomys natalensis (čeleď Muridae) je druh s extrémně velkým areálem rozšíření, zasahujícím téměř celou subsaharskou Afriku. Chromozomální variabilita v rámci druhu naznačuje, že se jedná spíše o druhový komplex několika zatím nepopsaných, blízkce příbuzných druhů. Obývá převážně nížiny a oblasti s vyšší vlhkostí v širokém spektru habitatů od savan a lesů až po zemědělskou krajinu v těsné blízkosti lidských sídel (Kingdon *et al.*, 2013). Mastomyši (obrázek 3-1) mají převážně noční aktivitu a jsou to oportunističtí všežravci (Leirs, 1995). Mají velké vrhy a v příhodných podmínkách se množí velmi rychle. Samice je březí průměrně 23 dní a rodí 6-20 mláďat (hmotnost 2-3 g). Mláďata otevírají oči během 13-17 dnů po porodu a odstavují se 30. den po narození. Mastomyši se průměrně dožívají tří let, pohlavní dospělosti dosahují už po 55-75 dnech (Fox, 2015). V příznivých podmínkách představuje *M. natalensis* často nejpočetnější druh hlodavce na sledovaných lokalitách, prodělává ale velké populační výkyvy, kdy nejvyšší a nejnižší abundance se liší až 40x (Leirs *et al.*, 1996; Happold & Happold, 1991). Hlodavci druhu *Mastomys natalensis* byli získáni z komerčního chovu (firma Karel Kaprál, Kralupy nad Vltavou, IČO: 45889368). V prostorách zvěřince katedry parazitologie PŘF UK byl zaveden jejich chov pro pokusné účely.

Myši kmene BALB/c jsou albinotické inbrední myši vyšlechtěné z myši domácí (*Mus musculus*). Tento kmen byl založen roku 1913 H. Baggem v New Yorku. Inbrední linie vznikla pářením sourozenců po 26 generací. Během několika desítek let se chov těchto myší rozšířil i do dalších států po celém světě (Wakelin, 1986). Dnes je tento kmen myší často používaným laboratorním zvířetem. BALB/c myši jsou velmi náchylné k řadě infekčních onemocnění a jsou často voleny jako pokusná zvířata pro studium leishmaniózy. Dodavatelem myší do roku 2015 byla společnost AnLab (Praha 4, IČO: 45796301), která dodávala BALB/c OlaHsd (původem z Harlan

Laboratories), od roku 2016 jsou myši BALB/c AnNCrI dodávány společností Velaz (Praha 6, IČO: 25691970).

Chovné skupiny (tři samice a jeden samec) i zvířata pro pokus (maximální počet 6 jedinců stejného pohlaví) jsou umístěny v akváriích typu T4 (58 x 37 x 20 cm, Velaz) v případě *M. natalensis* nebo v akváriích typu T2 (27.5 x 21.5 x 20 cm, Velaz) v případě myší, podestlané jemnými neprašnými pilinami a neprašným senem. Hlodavci mají nepřetržitý přístup k čisté pitné vodě ve skleněné napáječce a jsou krmeni standardní krmnou směsí ST-1 (Velaz) doplněnou čerstvou zeleninou a larvami *Zhophobas morio* (pouze v případě *M. natalensis*). V chovné místnosti se udržuje konstantní teplota 20-24 °C a vlhkost 45-50 %.



Obrázek 3-1: Chov *Mastomys natalensis*

Během našich pokusů jsme vypožorovali, že *M. natalensis* mají individuální reakce na anestetika (směs ketaminu a xylazinu), někteří jedinci nepřežívají ani 1/5 dávky anestetik používané standardně pro běžné druhy laboratorních zvířat. Dávkování bylo proto upraveno na 10 mg

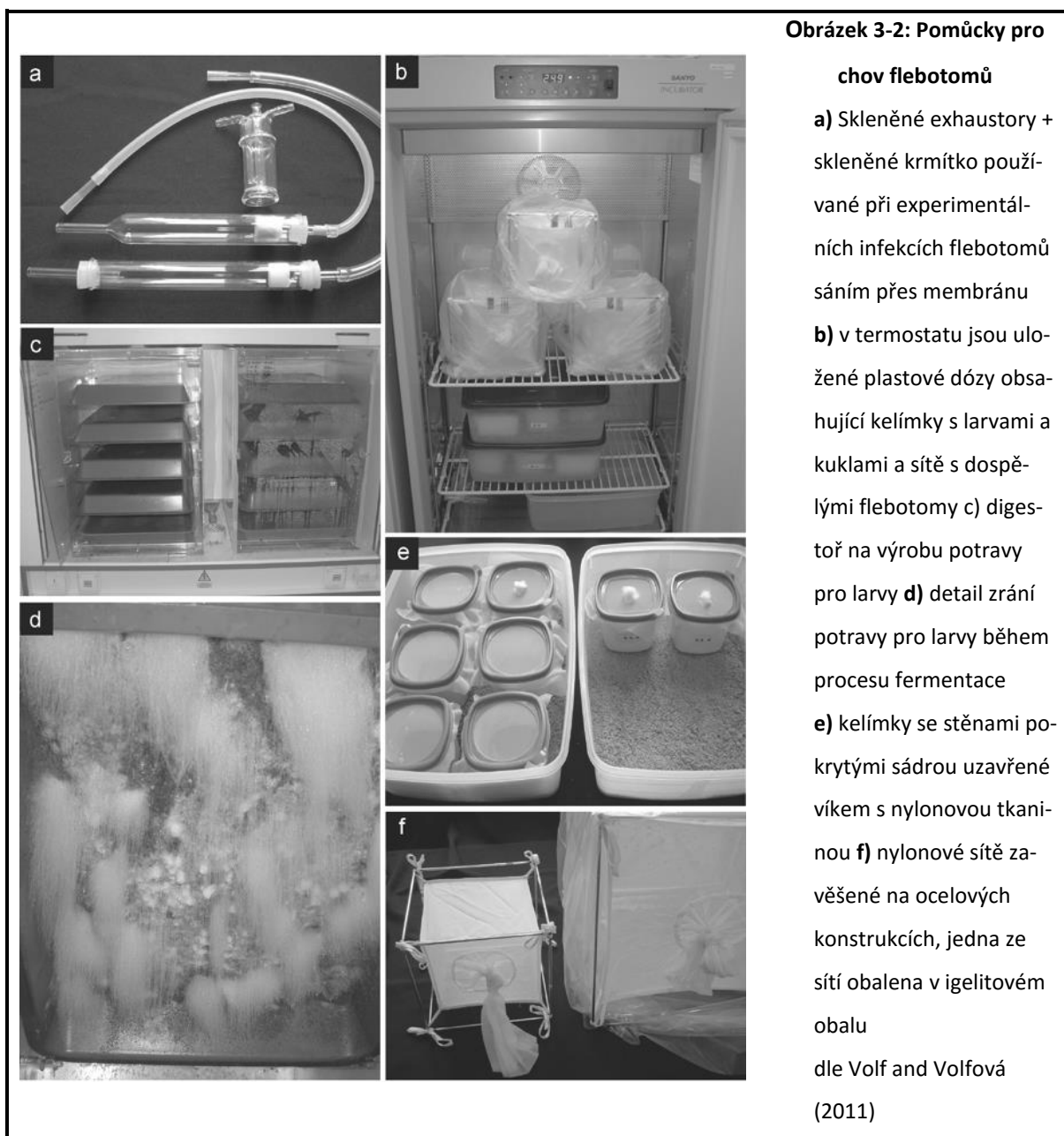
ketaminu + 2 mg xylazinu na 100 g hmotnosti zvířete oproti 150 mg/kg xylazinu a 15 mg/kg ketaminu používané pro uspávání myší kmene BALB/c.

Při chovu hlodavců i pokusech s nimi jsou dodržovány podmínky stanovené platnými legislativními předpisy (zákon č. 359/2012 Sb. na ochranu zvířat proti týrání; vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat). Chovná místnost má přidělenou akreditaci Ministerstvem zemědělství (č. j.: 13060/2014-MZE-17214, s platností do 3. 3. 2019). Chov *Mastomys natalensis* a xenodiagnostické pokusy byly schváleny Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy rozhodnutím č. MŠMT-10270/2015-5. Se zvířaty manipulují jen lidé s platným Osvědčením o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (B. Vojtková č. osvědčení CZ 03081, J. Sádlová č. osvědčení CZ 02566).

3.3 Chov flebotomů

Pro moji diplomovou práci byly použity samice druhu *Phlebotomus duboscqi* (původem ze Senegalu), přirozeného přenašeče *L. major* v subsaharské Africe.

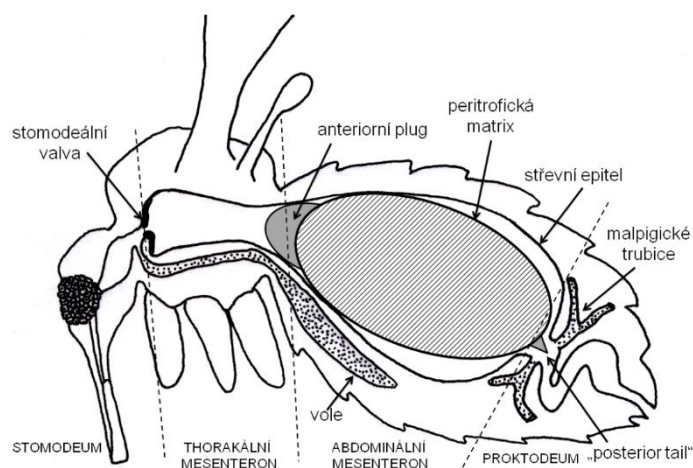
Kolonie flebotomů jsou chovány v místnostech k tomu určených. Zde se udržují ideální podmínky pro jejich vývoj a přežívání: vlhkost 50 %, teplota 26 °C, fotoperioda 14 hodin světlo/10 hodin tma. Dospělí jedinci jsou vypouštěni třikrát týdně do sítí z nylonu, ty jsou navázané na kovových konstrukcích. Sítě jsou umístěné do igelitových obalů a dovnitř je dána vata navlhčená destilovanou vodou, díky tomu se uvnitř sítě zvýší vlhkost na ideální hodnoty pro přežívání dospělců (70-95 %). Samci i samice jsou krmeni 50% roztokem sacharózy (vata napuštěná tímto roztokem na malé skleněné Petriho misce je vložena do sítě). Samice sají jednou nebo dvakrát týdně krev z uspané myši kmene BALB/c. Nasáté samice se po defekaci přemístí do kelímků se stěnami pokrytými sádkou (udržení vlhkosti) uzavřených víkem s nylonovou tkaninou. Kelímky jsou po šesti umístěny do plastových dóz, jejich dno je pokryto sterilizovaným navlhčeným pískem a vršek zakryt plastovým víkem (obrázek 3-2). Samice se do pěti dnů po zakelímkování vykladou a umírají. Z vajíček se líhnou larvičky (L1-L4), které se kuklí a následně z kukel vylétují dospělí jedinci, kteří jsou vypouštěni do nové sítě. Životní cyklus flebotomů trvá pět až osm týdnů za laboratorních podmínek. Larvičky (L1-L4) jsou krmeny na jemno namletou směsí pelet a králíčího trusu, která se čtyři týdny fermentuje při teplotě 25 °C a vysoké vlhkosti (Volf & Volfová, 2011).



3.4 Pitvy střev samic a vyšetřování vzorků střeva

Střeva nasátých samic *Phlebotomus duboscqi* byla pitvána 8. nebo 10. den po sání pro *in situ* vyšetření pod světelným mikroskopem. Během těchto dnů byly samice udržovány ve stejných podmínkách jako v kolonii. Samice byly pitvány pod binokulární lupou pomocí entomologické ostré pinzety a minuce vsazené do dřevěné špejle. Flebotomové se před pitvou uspali v kelímku na ledu a na podložním skle pod binokulární lupou jim bylo vypreparováno střevo, které se přeneslo do kapky čistého fyziologického roztoku a překrylo se krycím sklíčkem. Takto

vzniklý preparát byl vložen do světelného mikroskopu a vyšetřen na přítomnost leishmanií (Sádlová *et al.*, 2010). Intenzita infekce byla vyhodnocena *in situ* podle Myšková *et al.* (2008) jako nízká (<100 parazitů/střevo), střední (100-1000 parazitů/střevo) a vysoká (> 1000 parazitů/střevo) a byla popsána i lokalizace infekce ve střevě (stomodeální valva, thorakální mesenteron, abdominální mesenteron a proctodeum – obrázek 3-3).



Obrázek 3-3: Rozdělení trávicí soustavy flebotoma

do jednotlivých oddílů

dle Sádlová (nepublikováno)

3.5 Příprava slinných žláz

Pro experimentální infekci hlodavců byly použity slinné žlázy vypreparované ze samic flebotomů starých minimálně 3 dny (v této době je již utvořen kompletní proteinový profil, Volf *et al.*, 2000). Po uspání samic v kelímku na ledu, byly přeneseny pod binokulární lupu na okraj kapky fyziologického roztoku. Za pomoci entomologické ostré pinzety a minucie vsazené do dřevěné špejle byla plynule oddělena hlava od hrudi. Při zdárném oddělení zůstaly žlázy viset za hlavou a bylo je možné separovat od hlavy pomocí mírně zahnuté minucie a poté přenést do mikrozkušavky s fyziologickým roztokem (počet slinných žláz: μl roztoku = 1 : 1). Slinné žlázy byly uchovávány v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím byly žlázy homogenizovány pomocí minimálně 3x opakovaného zmrazení v tekutém dusíku.

3.6 Experimentální infekce flebotomů

3.6.1 Kultivace leishmanií

V této diplomové práci byl použit druh *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin/VI; FVI). Tato kultura se uchovává v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu obsahující 5–10 % kryokonzervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). Týden před použitím byly leishmanie vymrazeny a přeneseny do tekutého kultivačního média. Buňky byly kultivovány v plochých kultivačních zkumavkách při teplotě 23 °C. Po pěti dnech byla kultura přeočkována do nového média.

3.6.2 Experimentální infekce flebotomů

Promastigoti ze 4 dnů staré kultury *L. major* byli smícháni s tepelně inaktivovanou (35 minut při 56 °C) defibrilovanou králíčí krví (Bioveta) v poměru 10⁶ buněk/ml. Tato suspenze byla podávána samicím *P. duboscqi* ve skleněném krmítku potaženém kuřecí kůžíčkou (3ml/ krmítko). Kůžíčka byla získána z hřbetní strany třídenních usmrcených kuřat. Po stažení byla kůžíčka propláchnuta 2x v 70% čistém ethanolu a 2x ve sterilním fyziologickém roztoku a před použitím skladována v –20°C. V den pokusu byla kuřecí kůžíčka natažena a pomocí parafilmu připevněna na krmítko tak, aby samice flebotomů sály na její vnější straně. Samice *P. duboscqi* byly odděleny z kolonie do malé sítky (20 x 20 x 20 cm) natažené na ocelovou konstrukci. Sítka se samicemi byla připevněna na krmítko pomocí gumiček a kolíčků. Sání probíhalo v přítomnosti po dobu cca 2 hodin a krmítko bylo ohříváno na 37 °C vodní lázní s vnější cirkulací. Na konci sání byla sítka opatrně sundána z krmítka a nasáté samice vytříděny do nové sítky za pomoci exhaustoru. Pitvy samic byly prováděny 10. den po sání, do této doby byla sítka s navlhčenou vatou uvnitř (udržení konstantní vlhkosti) uložena v inkubátoru s teplotou 26 °C. Samicím byl podáván 50% roztok sacharózy napuštěný ve vatě (Volf & Volfová, 2011).

3.7 Experimentální infekce hlodavců

Myši kmene BALB/c a hlodavci rodu *Mastomys natalensis* byli infikováni intradermální injekcí parazity *L. major*, získanými z thorakálních částí mesenteronu *P. duboscqi*. Použitá metoda (Sádlová *et al.*, 2015) byla vybrána, aby se experiment co nejvíce přiblížil reálné situaci v přírodě a zároveň, aby bylo možné určit přesnou infekční dávku a místo vpichu.

Samice *P. duboscqi* byly experimentálně nakaženy parazitem *L. major* a deset až dvanáct dní po sání vypitvány a jejich střeva vyšetřena mikroskopicky na přítomnost leishmanií. V případě pozitivního výsledku byla thorakální část mesenteronu (místo akumulace infekčních metacyklických forem parazita) oddělena a přenesena do fyziologického roztoku. Celkem 80 thorakálních částí mesenteronu bylo homogenizováno ve 40 μ l fyziologického roztoku. K takto vzniklé suspenzi byly přidány 4 slinné žlázy samic *P. duboscqi* homogenizované ve 4 μ l fyziologického roztoku. Infekční dávka pro jednu myš čítala 10 TMG a 0,5 slinné žlázy. Přesné množství všech forem parazitů bylo vypočteno pomocí Burkerovy komůrky a poměr metacyklických forem stanoven na preparátech barvených Giemsou na základě morfologických kritérií popsaných ve studii Sádlová *et al.* (2010). Ve čtyřech opakováních experimentu s myši kmene BALB/c měly inokuláty následující složení: $8,5 \times 10^4$, 8×10^4 , $7,4 \times 10^4$ a $7,8 \times 10^4$ parazitů na myš a metacykly tvořily 72 %, 70 %, 64 % a 69 % ze všech stádií. V experimentu s *Mastomys natalensis* byly inokuláty $6,2 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^4$ metacykly tvořily 70 % a 69 %.

Samice myši kmene BALB/c a samci i samice *Mastomys natalensis* byli uspáni roztokem ketamin/xylazin a infikováni intradermální injekcí 5,5 μ l suspenze parazitů a slinných žláz do ušního boltce. Nakažení hlodavci byli týdně váženi a kontrolováni na přítomnost vnějších příznaků nemoci až do 10. týdne (myši kmene BALB/c) respektive 30. týdne (*Matomys natalensis*) po infekci, poté byli usmrceni a jejich tkáně vyšetřeny na přítomnost *L. major* metodou qPCR. V případě hlodavců *Mastomys natalensis* byli jedinci v jedné skupině usmrcováni postupně každých 5 týdnů (vždy po 2 jedincích) po dobu 30. týdnů a jejich tkáně vyšetřeny opět metodou qPCR.

3.8 Xenodiagnostika

V diplomové práci byla použita přímá xenodiagnostika (XD) pro testování infekitivity hostitele pro přenašeče. Hlodavci byli uspáni roztokem ketamin/xylazin a buď vloženi do plátěného pytlíčku, ze kterého vyčnívalo pouze infikované ucho (skupina XENO1, M-XENO), nebo jim byly překryty pouze oči navlhčenou vatou (skupina XENO2). Poté byli hlodavci jednotlivě vloženi do sítě s týden-starými samicemi *P. duboscqi* (40-120 samic flebotomů v každé síti) a vystaveni sání po dobu cca 1 hodiny. Nasáté samice *P. duboscqi* byly vytříděny do nové sítě, umístěny do inkubátoru s 26 °C a byl jim podáván 50% roztok sacharózy napuštěný ve vatě. Osmý den po infekci byly samice *P. duboscqi* vypitvány. Jejich střeva byla pod světelným mikroskopem

vyšetřena na přítomnost leishmanií. Pokud se jednalo o pozitivní preparát, byla určena intenzita infekce a lokalizace leishmanií ve střevě (Myšková *et al.*, 2008).

Při xenodiagnostických pokusech bylo použito celkem 55 hlodavců - 15 jedinců *Mastomys natalensis* a 40 jedinců laboratorní inbrední myši kmene BALB/c.

3.8.1 Schéma xenodiagnostického pokusu s myšmi kmene BALB/c

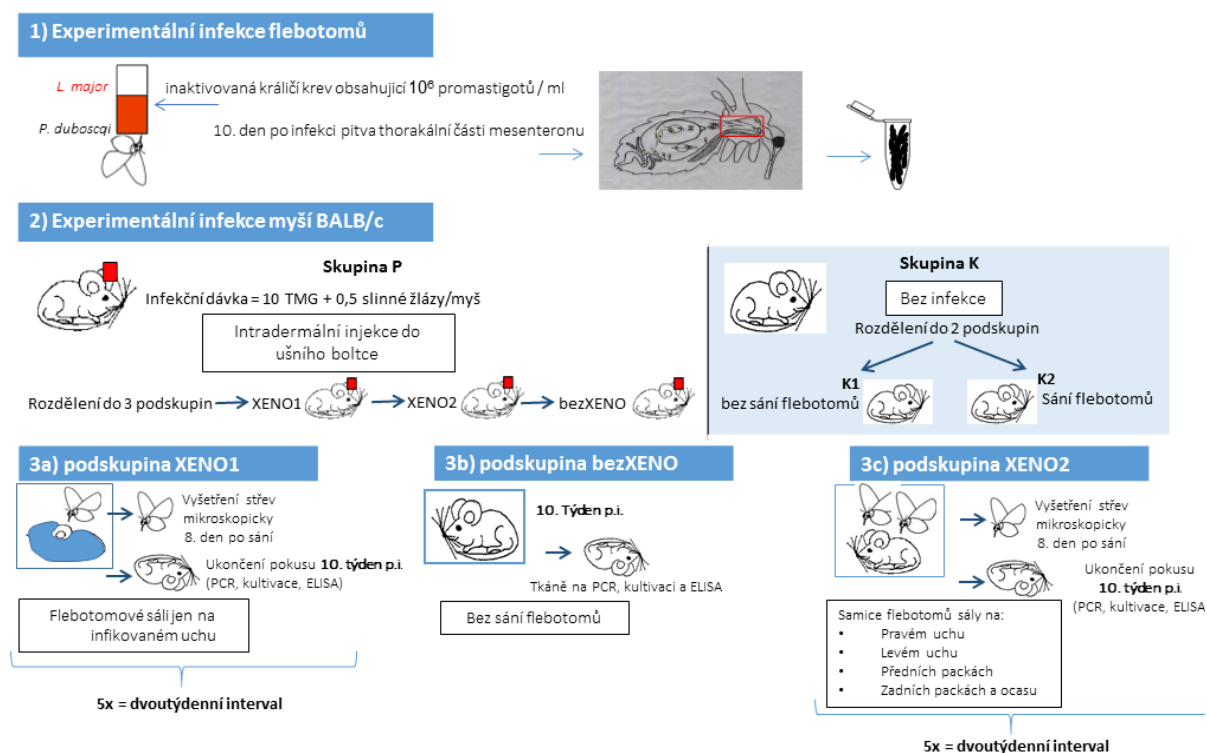
Prvním krokem bylo vytvoření infekční dávky pro myši použité v pokusu pomocí experimentální infekce flebotomů. Celkem cca 1500 samic *P. duboscqi* (v 1., 2. a 4. pokusu cca 300 samic, ve 3. pokusu cca 600 samic) bylo nakaženo sáním inaktivované králíčí krve obsahující 10^6 promastigotů *L. major* /ml přes membránu. Desátý den po infekci byly vypitvány infekční thorakální části mesenteronu (TMG) a přeneseny do fyziologického roztoku a přidány ještě slinné žlázy samic *P. duboscqi*. Infekční dávka pro jednu myš tak čítala 10 TMG a 0,5 slinné žlázy *P. duboscqi* ($7,3-9,5 \times 10^4$ leishmanií).

V xenodiagnostických pokusech bylo použito celkem 40 samic myší kmene BALB/c (obrázek 3-4). XD pokusy probíhaly ve čtyřech opakováních (1., 2., 4. pokus – 8 myší, 3. pokus – 16 myší). Samice myší byly rozděleny do 2 skupin – kontrolní skupina (K) a pokusná skupina (P).

Kontrolní skupina (K) čítající celkem 10 samic myší kmene BALB/c byla ponechána bez infekce *L. major* a byla rozdělena na 2 podskupiny – K1 a K2. Podskupina K1 (5 myší) nebyla vystavena poštípání *P. duboscqi*, zatímco podskupina K2 (5 myší) byla vystavena poštípání *P. duboscqi* každý sudý týden po dobu 10 týdnů. Samice *P. duboscqi* měly možnost sát na ucho (K2-ucho, 3 myši) nebo na celém těle (K2-tělo, 2 myši).

Druhá skupina (pokusná = P) čítající celkem 30 samic myší kmene BALB/c byla experimentálně nakažena intradermální injekcí parazitem *L. major* do ušního boltce. Tato skupina byla rozdělena do 3 podskupin – bezXENO (12 myší), XENO1 (12 myší) a XENO2 (6 myší). První podskupina (bezXENO) nebyla v průběhu experimentu testována pomocí xenodiagnostiky s výjimkou posledního týdne (10. týden p. i.), kdy byla vystavena poštípání flebotomy, aby bylo možno srovnat její infektivitu s ostatními podskupinami. Druhá podskupina (XENO1) byla vystavena xenodiagnostickým pokusům každý sudý týden po dobu 10 týdnů. Samice *P. duboscqi* měly možnost sát pouze na infikovaném uchu myši. XD pokus trval cca 60 minut a v síti bylo vždy 70-120 samic *P. duboscqi* (pro každou myš samostatná síť). Po hodině byla myš vyndána

ze sítě a nasáté samice byly vytrženy do nové sítě. Osmý den po sání byli flebotomové vypitváni a jejich střeva mikroskopicky vyšetřena na přítomnost leishmanií. Třetí podskupina (XENO2) byla také vystavena xenodiagnostickým pokusům každý sudý týden po dobu 10 týdnů, ale flebotomové měli možnost sát na celém těle uspané myši, přitom sají pouze na neosrstěných místech. XD pokus trval cca 60 minut. Uspaná myš byla vložena do malé sítě s 40-60 samicemi *P. duboscqi*. Mezitím byly připraveny další 4 malé sítě pro každou myš a popsané: levé ucho, pravé ucho, přední tlapky, zadní tlapky + ocas. Jakmile se flebotom nasál, byl bezprostředně odchyten pomocí exhaustoru a podle místa sání přenesen do jedné ze sítí. Osmý den po sání byli flebotomové vypitváni a jejich střeva mikroskopicky vyšetřena na přítomnost leishmanií. U všech skupin myši kmene BALB/c (P a K) byla každý týden zaznamenávána hmotnost myši a jejich klinický stav (kontrola vzniku lézí). Na konci pokusu (10. týden p. i.) byly myši usmrceny předávkováním anestetikem a stržením vazů a jejich tkáně byly použity na qPCR a kultivaci (detekce parazitů). Krevní sérum bylo použito pro stanovení hladiny protilátek proti *L. major* metodou ELISA.



Obrázek 3-4: Schéma xenodiagnostického pokusu s myšmi kmene BALB/c

3.8.2 Schéma xenodiagnostického pokusu s hlodavci *Mastomys natalensis*

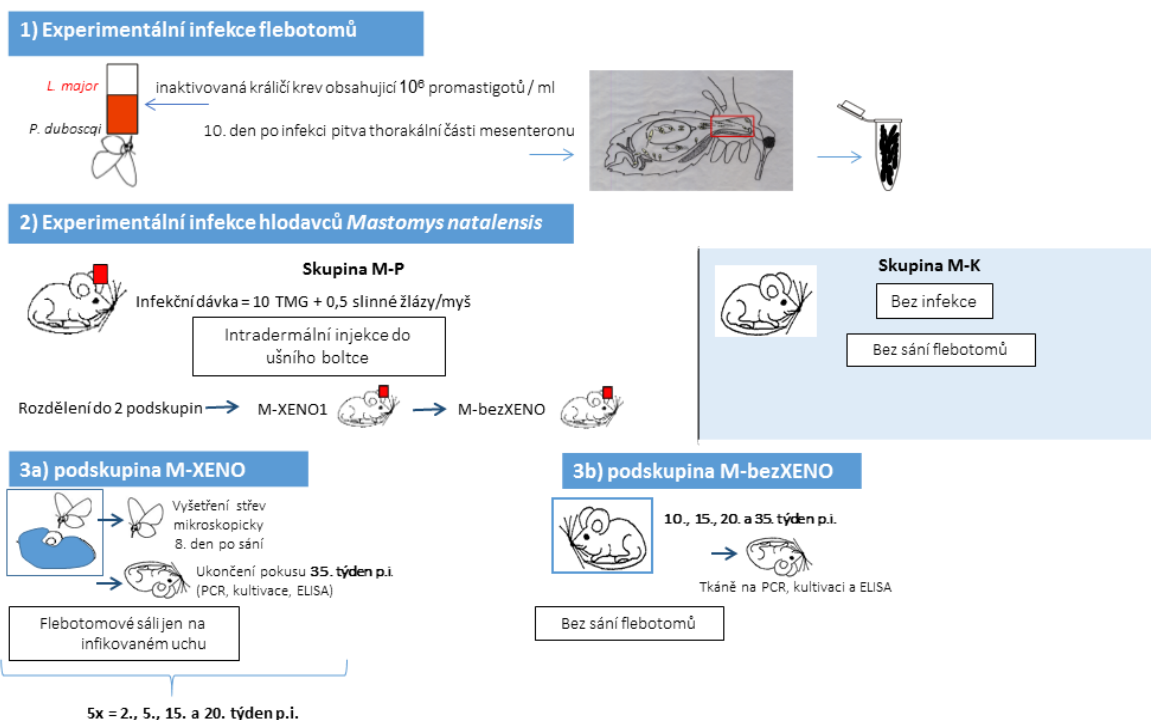
Infekční dávka pro hlodavce *Mastomys natalensis* byla vytvořena stejným způsobem jako v předchozím xenodiagnostickém pokuse s myšmi kmene BALB/c. Jediným rozdílem byla koncentrace promastigotů *L. major* pro experimentální infekce flebotomů, která byla vyšší a to 5×10^6 promastigotů /ml krve.

V xenodiagnostickém pokusu bylo použito 15 samic a pokus probíhal podobně jako v případě myší kmene BALB/c. Hlavním rozdílem byla délka trvání pokusu a intervaly XD. Hlodavci byli rozděleni do 2 skupin (obrázek 3-5) – kontrolní skupina (M-K) a pokusná skupina (M-P).

Kontrolní skupina (M-K) čítala 2 samice a byla ponechána bez infekce *L. major* a bez vystavení flebotomům. Pouze byla každý týden zaznamenávána hmotnost a kontrolován zdravotní stav hlodavců.

Pokusná skupina (M-P) čítající celkem 13 samic byla nakažena *L. major* stejným způsobem jako v případě myší kmene BALB/c. Infekční dávka byla $6,2 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^4$ leishmanií na myš. Třináct samic bylo rozděleno do 2 podskupin – M-XENO (6 myší) a M-bezXENO (7 myší). První podskupina (M-XENO) byla vystavena xenodiagnostickým pokusům 2., 5., 10., 15. a 20. týden. Samice *P. duboscqi* měly možnost sát pouze na infikovaném uchu hlodavců. Osmý den po sání byli flebotomové vypitváni a jejich střeva mikroskopicky vyšetřena na přítomnost leishmanií. Této skupině byla také každý týden zaznamenávána hmotnost a kontrolován zdravotní stav (kontrola vzniku lézí). Na konci pokusu (35. týden p. i.) byli hlodavci usmrceni a jejich tkáně byly použity na qPCR a kultivaci (detekce parazitů).

Druhá podskupina (M-bezXENO) nebyla v průběhu pokusu testována xenodiagnostickou metodou. Vždy dvě samice *M. natalensis* (výjimka 35. týden p. i. pouze jedna) byly postupně zabíjeny 10., 15., 20. a 35. týden p. i. a jejich tkáně byly použity pro detekci parazitů metodou qPCR a kultivace. Této skupině byla také každý týden zaznamenávána hmotnost a kontrolován zdravotní stav (kontrola vzniku lézí).



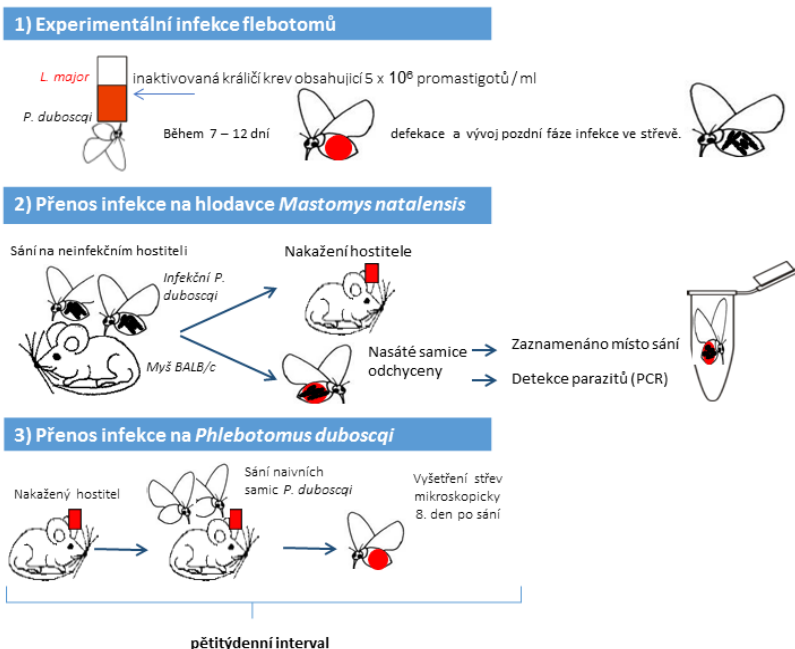
Obrázek 3-5: Schéma xenodiagnostického pokusu s hlodavci *Mastomys natalensis*

3.9 Přenosové pokusy

Přenosové pokusy (obrázek 3-6) umožňují otestovat celý koloběh onemocnění mezi hostitelem a přenašečem. Jedná se o experimentální přenos infekce sáním infikovaného hmyzího přenašeče a následnou reinfekci přenašeče sáním na takto nakaženém hostiteli.

Týden staré samice *P. duboscqi* byly nakaženy výše popsanou metodou, suspenzí *L. major* v králíčí krvi o koncentraci 5×10^6 promastigotů/ml. Poté byly nasáté samice vytříděny do nové sítě, umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 26 °C a byl jim podáván 50% roztok sacharózy napuštěný ve vatě. Během 7-12 dní došlo u samic k defekaci a vývoji pozdní fáze infekce ve střevě. Po této době jim bylo umožněno sání na uspaném naivním jedinci *Mastomys natalensis*. Nasáté samice byly bezprostředně odchyceny za pomoci exhaustoru a uchovávány při -20 °C pro pozdější detekci parazitů pomocí qPCR. U každé samice bylo zaznamenáno přesné místo sání.

Hlodavci byli následně každých 5 týdnů vystaveni sání naivních týden starých samic *P. duboscqi*, které byly po 8 dnech po nasátí vypitvány a jejich střeva byla vyšetřena mikroskopicky na přítomnost leishmanií. V tomto pokusu byli použiti celkem 4 samci a 4 samice *Mastomys natalensis*.



Obrázek 3-6: Schéma přenosových pokusů

3.10 Izolace DNA

K izolaci DNA leishmanií byly použity tkáně myši kmene BALB/c (10. týden po infekci) a hlodavců *Mastomys natalensis* (10., 15., 20., a 35. týden po infekci). Byly odebírány tyto tkáně a orgány:

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1) Krev | 6) Přední tlapky |
| 2) Levé ucho | 7) Zadní tlapky |
| 3) Pravé ucho | 8) Ocas |
| 4) Levá uzlina | 9) Slezina |
| 5) Pravá uzlina | 10) Játra |

Tkáně byly po pitvě přeneseny do jednotlivých mikrozkušavek a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Slezina a játra byly rozmělněny v 500 μl elučního pufru (Roche) a uchovávány stejným způsobem. DNA byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) viz protokol od výrobce. Vyizolovaná DNA byla eluovaná do 100 μl elučního pufru (Roche) a skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.11 Kultivace leishmanií ze tkání *Mastomys natalensis*

Detekce přítomnosti parazitů ve slezinách a játrech hlodavců *Mastomys natalensis* použitých v pokusu byla ověřena pomocí kultivace na krevním agaru. Část tkáně (3 x 3 mm) sleziny/jater byla po pitvě sterilně přenesena do kultivačních zkumavek. Z každé tkáně byly vytvořeny 2 vzorky. Vzorky byly kultivovány při teplotě 23 °C, každé tři dny byly zkumavky kontrolovány na přítomnost *L. major*. Výsledky pozorování byly zaznamenávány do protokolu.

3.12 Kvantitativní PCR

Detekce přítomnosti parazitů v jednotlivých tkáních hlodavců a jejich případná kvantifikace byla stanovena pomocí kvantitativní PCR (qPCR) založené na detekci vznikajícího amplikonu (dvouvláknového produktu) pomocí metody SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na přístroji iQ5 real-time PCR detection systém (Bio-Rad). Kinetoplastová DNA leishmanií byla amplifikována pomocí primerů:

- „forward primer“ 5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3'
- „reverse primer“ 5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'

Kvantitativní PCR provedl doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

3.13 ELISA

Pomocí ELISA testů (z anglického Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) jsme stanovovali protilátky proti *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin/VI; FVI) v sérech myší kmene BALB/c (10. týden po infekci).

Jamky mikrotitrační destičky byly pokryty antigenem získaným z kultury promastigotů *L. major* o koncentraci 5×10^6 promastigotů/ml. Navazování antigenu probíhalo 2 hodiny při 37 °C. Po dvou hodinách bylo provedeno promytí roztokem PBS-Tween sloužící k odstranění nena vázaného antigenu a dále byla volná vazebná místa blokována pomocí 6% mléka (Bio-Rad, kat. č. L1706404) ředěného v PBS-Tween po dobu 1 hodiny v inkubátoru při 37 °C. Po opakovaném promytí byla testovaná séra hlodavců (ředěna do 2% mléka v poměru 1 : 400) nanášena v objemu 100 µl/jamku. Inkubace vzorků probíhala 1 hodinu v inkubátoru při 37 °C. Po následném

promytí byl přidán konjugát (kozí imunoglobuliny proti myššímu IgG značené křenovou peroxidázou, Serotec STAR 120P) ředěný v PBS-Tween v poměru 1 : 1000 (1 hodina při 37 °C). Po uplynulé době a opakovaném promytí byl pro vizualizaci komplexu antigen-protilátka nanesen substrátový roztok s orthofenylendiaminem (OPD) a H₂O₂. Reakce probíhala za tmy a byla zastavena 10% roztokem kyseliny sírové (H₂SO₄). Absorbance byla měřena na spektrometru při vlnové délce 492 nm (převzato a upraveno z Leštinová, *et al.* 2015).

3.14 Statistika

Statistická byla provedena pomocí softwaru R (<http://cran.r-project.org/~HEAD=dobj>) a softwaru SPSS verze 23. Hladina statistické významnosti byla tradičně nastavena na $\alpha = 0,05$.

Pomocí neparametrického testu (Mann-Whitney U-test) byly testovány rozdíly mezi pokusnými skupinami (XENO a bezXENO) ve velikosti léze, v počtu parazitů v těle hostitelů, v hladině protilátek proti *L. major* a v procentech nakažených přenašečů.

Korelace mezi hladinami IgG protilátek proti *L. major* a počtem parazitů v inokulovaném uchu byly měřeny pomocí neparametrické Spearmanovy korelační analýzy.

Pomocí ANOVA- testů byly testovány 3 experimentální situace. Balíček „nlme“ (software R) byl použit k vytvoření dvou mixovaných lineárních modelů (lmm). V modelu 1 byla porovnávána závislost změny hmotnosti na týdn po infekci, na skupině hostitelů a na opakování pokusů (proměnné *tyden*, *skupina* a *pokus*). Změna hmotnosti představovala metrickou proměnnou, v našem případě gramy. Model 2 testoval, zda flebotomové preferují k sání některá místa hostitele více. Závislou proměnnou zde byl počet nasátých flebotomů a vysvětlujícími proměnnými potom místo sání (*misto*) a týden po infekci (*tyden*). Počet nasátých flebotomů představoval metrickou proměnnou. Balíček „geepack“ (software R) byl použit k vytvoření marginálního modelu (= model 3), ve kterém byl zkoumán vztah závislosti dynamiky vzniku lézí na ušním boltci na týdn po infekci, na skupině hostitelů a na opakování pokusu (proměnné *tyden*, *skupina* a *pokus*). Vznik lézí představoval dichotomickou proměnnou, v našem případě, zda léze byla nebo nebyla přítomna.

4 VÝSLEDKY

Výsledky předkládané diplomové práce obsahují dva tematické okruhy. První část je věnována zavedení laboratorního modelu pro studium xenodiagnostiky a vývoje infekce *L. major* u myší kmene BALB/c a sledování vlivu sání flebotomů na rozvoj infekce (kapitoly 4.1 a 4.2). Ve druhé části jsou zkušenosti získané na laboratorním modelu aplikovány na hlodavce druhu *Mastomys natalensis*, potencionální rezervoárové hostitele kožní leishmaniózy v subsaharské Africe (kapitola 4.3).

4.1 Pokusy s myšmi kmene BALB/c OlaHsd

V prvních dvou pokusech jsme jako hostitele používali 9-11 týdnů staré samice myší kmene BALB/c OlaHsd dodávané do naší laboratoře do roku 2015 firmou AnLab. Jedná se o linii kmene BALB/c pocházející z Harlan Laboratories (UK a Holandsko).

4.1.1 Průběh infekce: Změna hmotnosti a dynamika vzniku lézí

V rozmezí deseti týdnů jsme testovali rozvoj infekce myší kmene BALB/c OlaHsd infikovaných *L. major* spolu s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*. Průběh onemocnění byl hodnocen na základě změny hmotnosti testovaných jedinců a vzniku lézí na infikovaném uchu. Měření lézí a vážení myší bylo prováděno 1x týdně. Celkem šestnáct myší bylo rozděleno do 3 skupin: Čtyři myši sloužily jako kontrola (skupina K), dalších dvanáct myší bylo infikováno *L. major*, z nich šest (skupina XENO) bylo pravidelně vystavováno flebotomům v týdnech 2, 4, 6, 8 a 10 a šest myší (skupina bezXENO) bylo vystaveno XD až na závěr pokusu, v týdnu 10 (viz také Metodika – Schéma xenodiagnostického pokusu s myšmi kmene BALB/c).

Výsledky ze dvou po sobě následujících pokusů jsou shrnuty v tabulkách 4-1 a 4-2. Ke statistickému vyhodnocení hmotnosti byl použit model 1 (viz. Metodika – Statistika). Hmotnost signifikantně rostla se stářím myší ($P < 0,0001$), ale rozdíly mezi pokusnými skupinami ($P = 0,5006$) ani mezi dvěma pokusy ($P = 0,5586$) nebyly statisticky významné (tabulka 4-3).

Naopak jsme zaznamenali signifikantní rozdíly mezi skupinami v dynamice vzniku, růstu a velikosti lézí. U kontrolní skupiny K2 (myši neinfikované *L. major*, ale vystavené flebotomům) docházelo pouze k začervení ušního boltce týden po poštípání flebotomy, ale během 3-4 dnů vždy spontánně odeznělo. U obou pokusných skupin došlo v rozdílném čase po infekci k tvorbě lézí (obrázek 4-1 a 4-2). Dynamika vzniku a růstu lézí byla testována pomocí modelu 3 (viz. Metodika – Statistika) a výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4-4. U skupiny XENO1 se léze vytvářely v průměru o týden dříve a rostly prokazatelně rychleji ($P = 0.0079$). Mimo této závislosti byl signifikantní i vliv týdnu p. i. ($P = 0.0023$) a rozdíl mezi oběma pokusy ($P = 0,0077$), i když oba pokusy vykazovaly stejnou tendenci. V 10. týdnu p. i. jsme testovali (Mann-Whitney U-test tabulka 4-5 a obrázek 4-3) rozdíl ve velikosti lézí mezi oběma skupinami. XENO1 skupina sice měla v průměru o 3,5 mm větší léze, ale výsledek je těsně nad hranicí signifikance ($P = 0,093$).

Týden p. i.	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	A2	B2	C2	D1	E1	F1	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
0	21	21	22	21	21	22	21	22	22	21	22	22	20	20	21	20
1	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21	20	21	20
2	23	23	23	23	23	23	23	23	24	23	23	24	23	22	23	20
3	24	23	23	24	23	23	23	23	24	23	23	24	23	22	23	21
4	24	24	25	24	24	25	24	24	26	24	24	26	23	22	24	21
5	25	24	25	25	24	25	24	24	27	24	24	27	24	22	24	21
6	25	25	25	25	25	25	25	25	26	25	25	26	24	23	24	21
7	26	25	25	26	25	25	26	26	28	26	26	28	23	24	25	22
8	27	25	26	27	25	26	26	25	26	26	25	26	23	24	25	22
9	27	25	26	27	25	26	25	24	26	25	24	26	25	24	26	22
10	27	25	26	27	25	26	25	25	26	25	25	26	25	25	26	23

Hodnoty jsou uvedeny v gramech. A1, B1, C1... = myši z prvního pokusu; A2,B2,C2... = myši z druhého opakování pokusu

Tabulka 4-1: Hmotnost myši BALB/c OlaHsd v průběhu pokusu

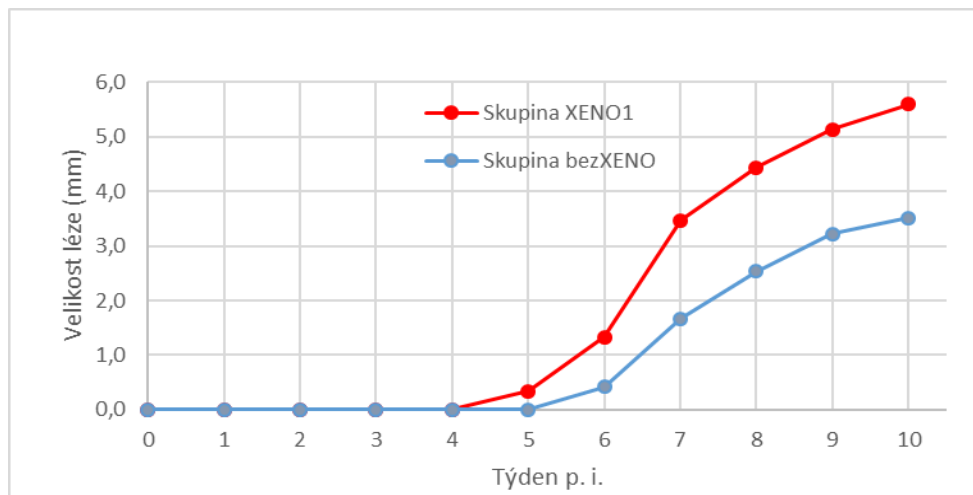
Týden p. i.	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	A2	B2	C2	D1	E1	F1	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	1,0	3,1	1,5	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	2,4	2,1	2,8	5,8	3,8	3,9	0,0	0,0	1,7	2,5	3,3	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
8	2,6	3,6	3,2	7,0	5,2	5,0	0,0	0,0	2,7	3,5	5,5	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0
9	2,9	5,5	4,4	10,0	6,7	5,3	0,0	0,0	2,9	4,6	6,4	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0
10	4,9	6,5	5,3	10,0	10,0	10,0	0,0	0,0	4,7	8,0	10,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Hodnoty jsou uvedeny v milimetrech. A1, B1, C1... = myši z prvního pokusu; A2,B2,C2... = myši z druhého opakování pokusu

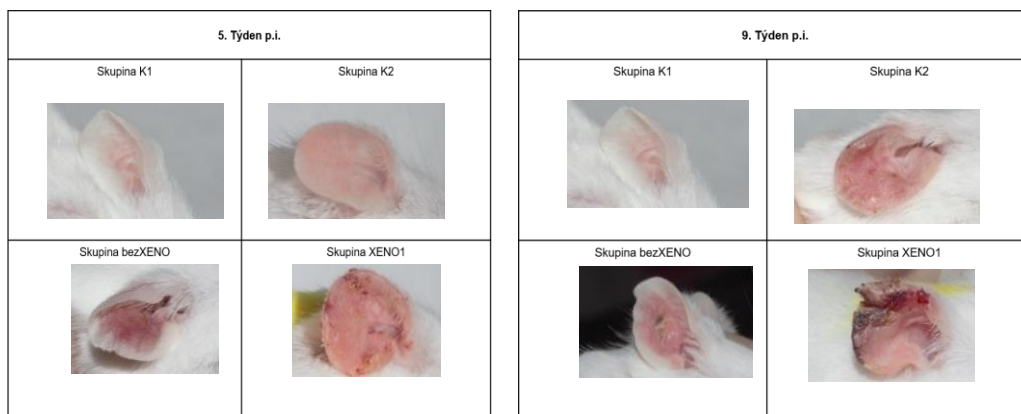
Tabulka 4-2: Velikost lézí myší BALB/c OlaHsd v průběhu pokusu

	numDF	denDF	F-value	p-value
(intercept)	1	157	255.2260	<0.0001
Tyden	1	157	596.3070	<0.0001
skupina	2	12	0.7335	0.5006
pokus	1	12	0.3619	0.5586
Tyden: skupina	2	157	2.0522	0.1319

Tabulka 4-3: Závislost hmotnosti myší BALB/c OlaHsd na týdnu p. i., skupině a pokusu (ANOVA tabulka v rámci modelu 1)



Obrázek 4-1: Velikost lézí u myší BALB/c OlaHsd



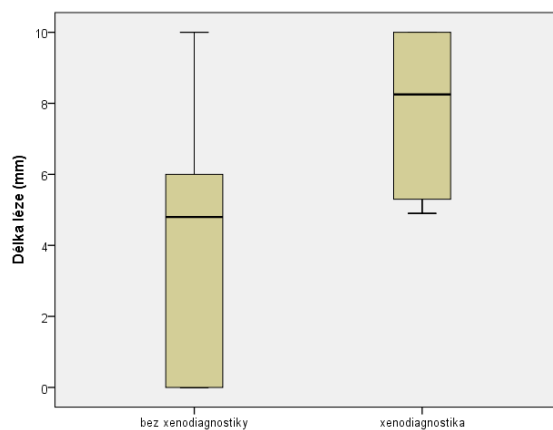
Obrázek 4-2: Fotografie uší myši BALB/c OlaHsd

	Df	X2	p-value
Tyden	1	9.3237	0.002262
skupina	1	7.0675	0.007850
pokus	1	7.1136	0.007650
tyden:skupina	1	4.8775	0.027210

Tabulka 4-4: Závislost dynamiky tvorby lézí u myši BALB/c OlaHsd na týdnu p. i., skupině a pokusu (ANOVA tabulka v rámci modelu 3)

		Statistic	
		bezXENO	XENO
Tézerozměr	Mean	4,27	7,78
	Median	4,80	8,25
	Std. Deviation	3,818	2,485
	Minimum	0	5
	Maximum	10	10
	Total N	12	
	Test statistic	29,000	
	p-value	0,093	

Tabulka 4-5: Rozdíl velikosti lézí u dvou pokusných skupin myši BALB/c OlaHsd v 10. týdnu p. i. (Statistický výstup a Mann-Withney U-test)



Obrázek 4-3: Velikostí lézí u dvou pokusných skupin myši BALB/c OlaHsd v 10. týdnu p. i.

4.1.2 Průběh infekce: Distribuce parazitů v těle hostitelů a tvorba protilátek proti *L. major*

Distribuce *L. major* byla v jednotlivých tkáních myši kmene BALB/c OlaHsd stanovena pomocí qPCR. V prvních dvou pokusech byla porovnána distribuce parazitů mezi dvěma pokusnými skupinami (XENO1 a bezXENO). Jak je vidět v tabulce 4-6, myši patřící do skupiny XENO1 měly parazity celkem v šesti typech tkání, zatímco myši patřící do skupiny bezXENO měly napadeny pouze čtyři typy tkání. Pomocí Mann-Whitneyho U-testu byl statisticky zhodnocen rozdíl v počtu parazitů v místě sání flebotomů (pravé ucho) mezi pokusnými skupinami. Přestože skupina XENO1 měla v uchu v průměru více parazitů (tabulka 4-7 a obrázek 4-4), rozdíl mezi skupinami není signifikantní kvůli extrémně vysoké hodnotě u myši D2 ($P = 0,180$).

Třetí pokus byl zaměřen na porovnávání infekivity jednotlivých částí těla pro flebotomy. Výsledky PCR u skupiny XENO2 jsou shrnuty v tabulce 4-8. U všech šesti myší, byla *L. major* detekována v pravém uchu a v pravé uzlině (100 %), ale v ocasu a levé uzlině byla *L. major* detekována v nízkém počtu vždy jen u jedné myši ze šesti (17 %). Tyto výsledky korelují s procentem infikovaných přenašečů (viz kapitola 4.1.3).

Průběh infekce byl hodnocen i pomocí měření anti-*L. major* protilátek v séru myší 10. týden p. i. metodou ELISA. Z tabulky 4-9 a z obrázku 4-5 vyplývá, že skupina nevystavená sání flebotomů (bezXENO) vykazovala oproti skupině vystavené sání flebotomů (XENO) signifikantně nižší hladiny protilátek proti *L. major* ($P = 0,004$). Korelace tvorby protilátek s počtem parazitů v inokulovaném uchu jednotlivých myší obou linií je shrnuta v kapitole 4.3.

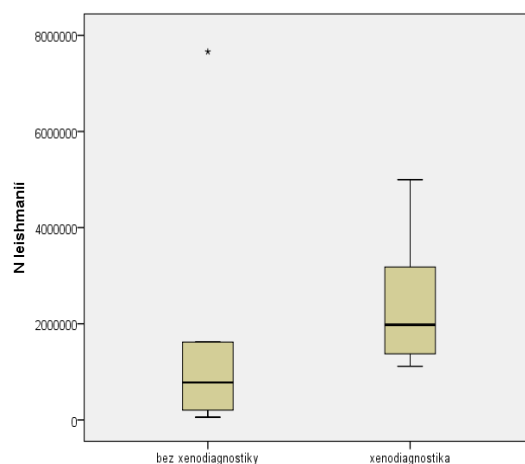
Tkáň	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	A2	B2	C2	D1	E1	F1	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
krev	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
pravé ucho	7+	7+	7+	7+	7+	7+	5+	6+	6+	8+	7+	6+	neg	neg	neg	neg
levé ucho	4+	neg	neg	6+	5+	6+	neg	neg	neg	4+	neg	neg	neg	neg	neg	neg
pravá uzlina	4+	4+	4+	6+	5+	5+	4+	4+	3+	5+	4+	4+	neg	neg	neg	neg
levá uzlina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
přední tlapky	5+	neg	4+	4+	neg	5+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
zadní tlapky	neg	neg	4+	neg	neg	5+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
ocas	neg	neg	neg	5+	5+	5+	neg	5+	neg	6+	neg	neg	neg	neg	neg	neg
slezina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
játra	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

neg = negativní; 3+ = $10^2 - 10^3$ parazitů; 4+ = $10^3 - 10^4$ parazitů; 5+ = $10^4 - 10^5$ parazitů; 6+ = $10^5 - 10^6$ parazitů; 7+ = $10^6 - 10^7$ parazitů; 8+ = $10^7 - 10^8$ parazitů. A1, B1, C1... = myši z prvního pokusu; A2, B2, C2... = myši z druhého opakování pokusu

Tabulka 4-6: Počet parazitů v jednotlivých tkáních myši BALB/c OlaHsd (XENO1 skupina)

		Statistic	
		bezXENO	XENO
Počet parazitů	Mean	1849501,3	2438445,2
	Median	778755,5	1980402,5
	Std. Deviation	2898957,5	1462730,3
	Minimum	56914	1114903
	Maximum	7658324	4998316
	Total N	12	
	Test statistic	27,000	
	p-value	0,1800	

Tabulka 4-7: Počet parazitů v uších myši BALB/c OlaHsd 10. týden p. i. (Statistický výstup a Mann-Whitney U-test)



Obrázek 4-4: Počet parazitů v uších myši BALB/c OlaHsd 10. týden p. i.

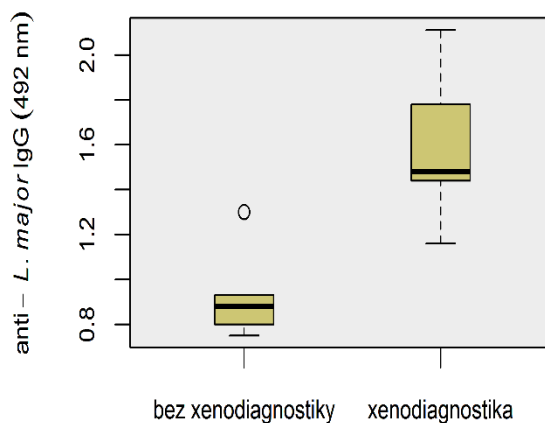
Tkáň	Skupina XENO2					
	A	B	C	D	E	F
krev	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
pravé ucho	7+	7+	6+	6+	7+	6+
levé ucho	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
pravá uzlina	6+	6+	5+	5+	5+	4+
levá uzlina	neg.	5+	neg.	neg.	neg.	neg.
přední tlapky	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
zadní tlapky	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
ocas	4+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
slezina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
játra	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

neg. = negativní; 4+ = $10^3 - 10^4$ parazitů; 5+ = $10^4 - 10^5$ parazitů; 6+ = $10^5 - 10^6$ parazitů; 7+ = $10^6 - 10^7$ parazitů; 8+ = $10^7 - 10^8$ parazitů

Tabulka 4-8: Počet parazitů v jednotlivých tkáních myši BALB/c OlaHsd (XENO2 skupina)

		Statistic	
		bezXENO	XENO
anti-L. major IgG	Mean	0,923	1,575
	Median	0,88	1,480
	Std. Deviation	0,196	0,328
	Minimum	0,75	1,16
	Maximum	1,3	2,11
	Total N	12	
	Test statistic	1	
	p-value	0,004	

Tabulka 4-9: Hladina protilátek proti *L. major* u myši BALB/c OlaHsd 10. týden p. i. (Statistický výstup a Mann-Whitney U-test)



Obrázek 4-5: Hladina protilátek proti *L. major* u myši BALB/c OlaHsd 10. týden p. i.

4.1.3 Infektivita hostitelů pro přenašeče *P. duboscqi*

V průběhu 10 týdnů bylo porovnáno procento nakažených samic *P. duboscqi*, které měly možnost sát na myších kmene BALB/c OlaHsd vždy každý sudý týden. V pokusech bylo použito 22 samic myší kmene BALB/c OlaHsd a celkem bylo mikroskopicky vyšetřeno 2390 střev nasátých přenašečů *P. duboscqi*. U většiny pitvaných samic s pozitivním výsledkem se jednalo o silné nákazy (96 % infekcí), kdy leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu (82 % infekcí).

V prvních dvou pokusech byla porovnána infektivita ušního boltce hostitelů (tabulka 4-10). Samice *P. duboscqi* se nakazily hned 2. týden p. i. (XENO1 skupina). Infektivita kontinuálně rostla do 6. týdnu p. i. až na 14,8 % a potom stagnovala (v 8. týdnu p. i. 13,4 %, a v 10. týdnu p. i. 13,5 %). V 10. týdnu p. i. byla testována i infektivita bezXENO skupiny. Pomocí Mann-Whitneyho U-testu jsme zjistili, že v tomto čase neexistuje mezi pokusnými skupinami (XENO1 a bezXENO) signifikantní rozdíl v infektivitě pro flebotomy (tabulka 4-11 a obrázek 4-6), i když se ve velikosti léze skupiny lišily.

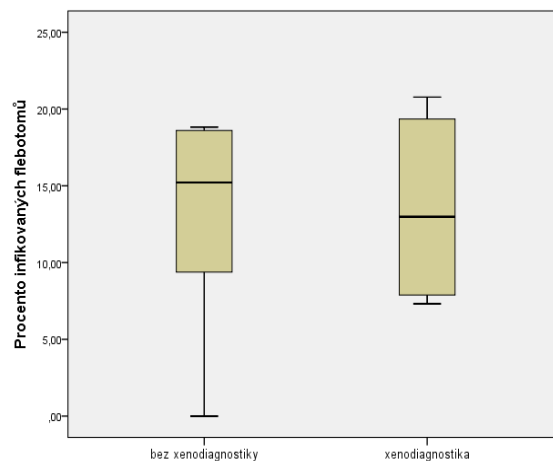
Ve třetím pokusu byla porovnána infektivita různých částí těla hostitelů pro *P. duboscqi*. Z tabulky 4-12 je zřejmé, že samice flebotomů nejvíce preferovaly sání na zadních tlapkách a ocasu v porovnání s ostatními částmi těla myši, to bylo potvrzeno i modelem 2 (Metodika – Statistika) ($P = <0.0001$). Výsledky testu jsou shrnuty v tabulce 4-13. U tří ze šesti myší se flebotomové nakazili sáním pouze z pravého ucha (2., 4. a 10. týden p. i.), místa inokulace parazitů a hodnota nákazy činila v průměru 12,8 % (v 2. týdnu p. i. 16,7 %, ve 4. týdnu p. i. 20 % a v 10. týdnu p. i. 27,3 %), ale ani jeden flebotom ze 480 vypitvaných se nenakazil sáním z ostatních částí těla. Tyto výsledky korelují s distribucí parazitů ve tkáních myší v XENO2 skupině, jak je vidět na obrázku 4-7.

týden PBM	skupina	Myš	<i>P. duboscqi</i>			
			N sálo	pitváno	pozitivní	% pozitivních
2	Skupina XENO1	A1	77	45	0	0,0
		B1	55	16	0	0,0
		C1	78	21	1	4,7
		A2	67	23	0	0,0
		B2	54	19	0	0,0
		C2	52	20	0	0,0
		Σ	383	144	1	0,8
4	Skupina XENO1	A1	71	31	0	0,0
		B1	69	37	3	8,1
		C1	42	4	0	0,0
		A2	92	40	2	5,0
		B2	78	36	4	11,1
		C2	105	57	2	3,5
		Σ	457	205	11	4,6
6	Skupina XENO1	A1	97	59	2	3,4
		B1	82	53	13	24,5
		C1	78	46	4	8,7
		A2	56	21	4	19,0
		B2	59	18	5	27,8
		C2	71	18	1	5,6
		Σ	443	215	29	14,8
8	Skupina XENO1	A1	77	47	3	6,4
		B1	95	61	7	11,5
		C1	73	42	15	35,7
		A2	48	20	3	15,0
		B2	79	56	4	7,1
		C2	105	89	4	4,5
		Σ	477	315	36	13,4
10	Skupina XENO1	A1	105	77	16	20,8
		B1	102	68	6	8,8
		C1	108	70	12	17,1
		A2	67	41	3	7,3
		B2	65	31	6	19,4
		C2	66	38	3	7,9
		Σ	513	325	46	13,5
	Skupina bezXENO	D1	83	46	8	17,4
		E1	119	85	16	18,8
		F1	121	86	16	18,6
		D2	55	32	3	9,4
		E2	58	46	3	6,5
		F2	40	12	6	50,0
		Σ	476	307	52	20,1

Tabulka 4-10: Xenodiagnostické pokusy na infikovaném uchu myši BALB/c OlaHsd (XENO1 skupina)

		Statistic	
		bezXENO	XENO
%infikovaných	Mean	12,8717	13,5500
	Median	15,2150	12,9800
	Std. Deviation	7,30084	6,19713
	Minimum	,00	7,32
	Maximum	18,82	20,78
	Total N	12	
	Test statistic	18,000	
	p-value	1,000	

Tabulka 4-11: Infektivita myší BALB/c OlaHsd v 10. týdnu p. i.
(Statistický výstup a Mann-Withney U-test)



Obrázek 4-6: Infektivita myší BALB/c OlaHsd v 10. týdnu p. i.

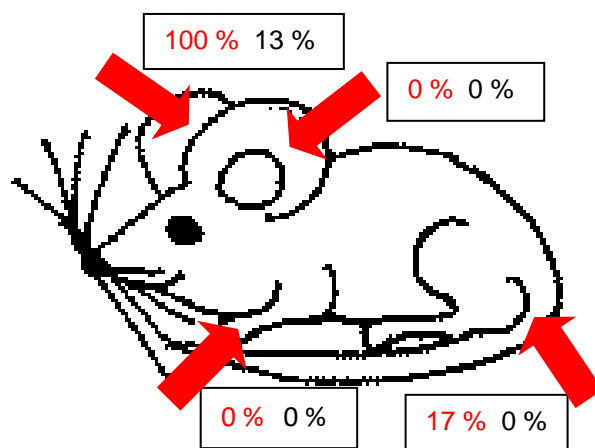
Místo sání	Týden p. i.					Σ
	2	4	6	8	10	
	Počet pitvaných samic (% pozitivních)					
Pravé ucho	6 (16.7)	5 (20.0)	7 (0)	10 (0)	11 (27.3)	39 (12.8)
Levé ucho	10 (0)	6 (0)	13 (0)	12 (0)	8 (0)	49 (0)
Přední tlapky	71 (0)	36 (0)	64 (0)	47 (0)	45 (0)	263 (0)
Zadní tlapky + ocas	109 (0)	62 (0)	134 (0)	112 (0)	111 (0)	528 (0)

Tabulka 4-12: Xenodiagnostické pokusy na celém těle myší BALB/c OlaHsd (XENO2 skupina)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(intercept)	1	110	1065.8711	<0.0001
tyden	1	110	0.9055	0.3434
misto	3	110	117.9913	<0.0001

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(intercept)	1.061024	0.23269794	110	4.559663	0.0000
tyden	0.026852	0.02821877	110	0.951579	0.3434
misto:leveucho	-0.019345	0.22575016	110	-0.085692	0.9319
misto:prednitlapky	1.984941	0.22575016	110	8.792645	0.0000
misto:zad-nitlapky+ocas	3.568914	0.22575016	110	15.809131	0.0000

Tabulka 4-13: Test preference místa sání *P. duboscqi* na myších BALB/c OlaHsd (ANOVA tabulky v rámci modelu 2)



červeně = procento tkání nakažených *L. major*

černě = procento *P. duboscqi* nakažených na daném místě

Obrázek 4-7: Grafické znázornění korelace mezi procentem nakažených přenašečů *P. duboscqi* a počtem parazitů ve tkáních myší BALB/c OlaHsd

4.2 Pokusy s myšmi kmene BALB/c AnNCrI

Ve třetím pokusu jsme jako hostitele používali 11 týdnů staré myši kmene BALB/c AnNCrI, které do naší laboratoře dováží od začátku roku 2016 firma Velaz. Jedinci kmene BALB/c AnNCrI jsou potomci chovného jádra pocházejícího z NIH (National Institutes of Health, USA), které se roku 1974 přesunulo do Charles River Laboratories (USA).

4.2.1 Průběh infekce: Změna hmotnosti a dynamika vzniku lézí

V rozmezí deseti týdnů jsme testovali rozvoj infekce u myši kmene BALB/c AnNCrI infikovaných *L. major* spolu s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*. Uspořádání pokusu bylo stejné jako v případě myši kmene BALB/c OlaHsd s tím rozdílem, že všechna zvířata byla infikována v jediném pokusu. Hmotnost sledovaných zvířat je uvedena v tabulce 4-14 a byla statisticky vyhodnocena pomocí modelu 1 - viz Metodika – Statistika (tabulka 4-15). Hmotnost také signifikantně rostla se stářím myši ($P < 0,0001$) a rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné ($P = 0.0580$), stejně jako v případě pokusů s BALB/c OlaHsd.

Dynamika tvorby lézí byla u linie BALB/c AnNCrI zcela jiná než u linie BALB/c OlaHsd (tabulka 4-16, obrázek 4-8). U skupiny K2 také došlo týden po poštípání flebotomy k začervení ušního boltce, které během 3-4 dnů vždy spontánně odeznělo. U skupiny XENO1 se v průměru 4. týden p. i. vytvořily noduly, které se během 5. týdne p. i. vyvinuly v malé léze (1 mm). Ty se uzavřely 6. týden p. i. a na ušním boltci byl patrný pouze nodule, který se zvětšoval až do konce pokusu (10. týden p. i.). U skupiny bezXENO se léze ani noduly až do 10. týdne nevytvořily.

Týden p. i.	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
0	22	20	21	22	23	22	21	22	22	22	21	23	22	21	21	21
1	22	20	21	22	23	22	22	22	23	22	22	23	24	22	21	23
2	23	21	22	22	24	23	22	23	23	23	22	24	24	22	22	24
3	23	22	22	23	24	23	23	23	24	24	23	25	24	23	23	25
4	22	22	22	24	24	24	23	24	25	24	23	26	24	24	23	25
5	23	21	23	24	25	24	23	24	24	24	23	26	25	23	23	25
6	24	22	23	24	25	24	22	25	24	23	22	25	25	23	24	25
7	24	23	24	24	25	23	23	25	24	24	23	26	25	22	23	26
8	24	23	24	24	25	23	23	25	24	24	23	26	25	23	23	25
9	24	23	25	24	24	23	23	25	24	25	24	26	26	23	23	26
10	24	24	25	24	25	23	23	25	25	25	24	26	26	23	23	27

Hodnoty jsou uvedeny v gramech

Tabulka 4-14: Hmotnost myší BALB/c AnNCrI v průběhu pokusu

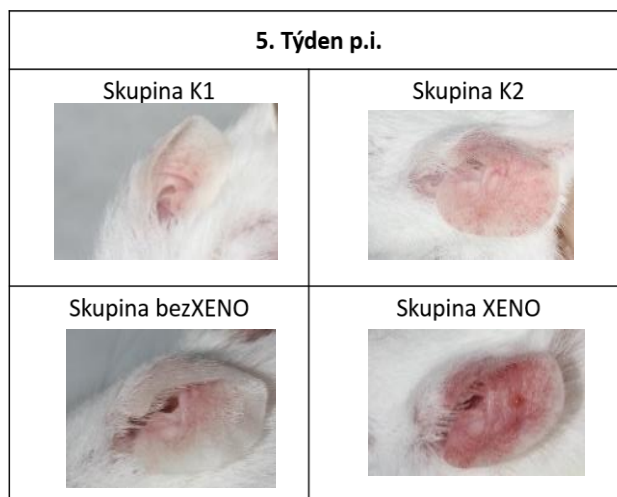
	numDF	denDF	F-value	p-value
(intercept)	1	157	179.70834	<0.0001
tyden	1	157	268.52677	<0.0001
xenocat	2	13	3.57229	0.0580
Tyden:xenocat	2	157	0.11311	0.8931

Tabulka 4-15: Závislost hmotnosti myší BALB/c AnNCrI na týdnu p. i. a skupině (ANOVA tabulka v rámci modelu 1)

Týden p. i.	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	R	R	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Č	Č	0
3	R	Č	Č	Č	0	0	0	Č	0	0	0	0	0	0	0	0
4	N	Č	1	1	0	R	0	Č	0	0	0	0	0	0	0	0
5	N	1	1	2	Č	Č	0	0	0	0	0	0	0	R	Č	0
6	N	2	N 2	2	0	Č	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Č	1	N 2	3	0	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	VmL	N 1	N 2,8	2	0	N 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1,8	N 1,3	N 3,3	N 4,2	Č	N 1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	R	0
10	2,2	N 1,5	N 4	N 5,3	Č	Č	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R = růžové; Č = červené; N = nodul; N číslo= velikost nodulu, číslo = velikost léze, VmL = více malých lézí. Hodnoty jsou uvedeny v milimetrech

Tabulka 4-16: Velikost lézí myší BALB/c AnNCrI v průběhu pokusu



Obrázek 4-8: Fotografie uší myší BALB/c AnNCrI v 5. týdnu p. i.

4.2.2 Průběh infekce: Distribuce parazitů v těle hostitelů a tvorba protilátek proti *L. major*

Distribuce *L. major* byla v jednotlivých tkáních myší kmene BALB/c AnNCrI stanovena pomocí qPCR. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4-17. Ve skupině XENO1 bylo na *L. major* pozitivních pět myší ze šesti, ve skupině bezXENO jen tři ze šesti. V levém uchu (místo inokulace *L. major*) a ve slezině byli paraziti detekováni u obou skupin, u XENO1 skupiny byli přítomni navíc v pravém uchu, zatímco u bezXENO skupiny v předních a zadních tlapkách. Pomocí Mann-Whitneyova U-testu byl statisticky zhodnocen rozdíl mezi pokusnými skupinami v počtu parazitů v místě sání flebotomů (levé ucho), ze kterého vyplývá (tabulka 4-18 a obrázek 4-9), že rozdíl mezi skupinami není statisticky významný ($P = 0,093$).

Mimo qPCR byly myši kmene BALB/c AnNCrI testovány na přítomnost protilátek proti *L. major* v sérech 10. týden p. i. Výsledky ELISA testu jsou shrnuty v tabulce 4-19 a na obrázku 4-10. Stejně jako v případě myší BALB/c OlaHsd jsme zaznamenaly signifikantně nižší hladiny protilátek u skupiny nevystavené sání flebotomů (bezXENO) než u skupiny (XENO) vystavené sání flebotomů ($P = 0,005$). Korelace mezi počtem parazitů v inokulovaném uchu a hladinou protilátek proti *L. major* je popsána v kapitole 4.3.

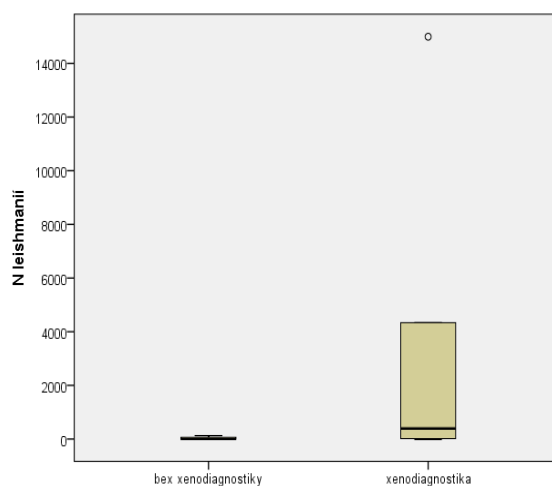
Tkáň	Skupina XENO						Skupina bezXENO						Skupina K			
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G1	H1	G2	H2
krv	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
pravé ucho	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
levé ucho	neg	2+	5+	3+	4+	2+	neg	2+	3+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
pravá uzlina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
levá uzlina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
přední tlapky	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg
zadní tlapky	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
ocas	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
slezina	neg	neg	1+	neg	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
játra	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

neg. = negativní; 1+ = < 10 parazitů; 2+ = 10 – 10²; 3+ = 10² – 10³ parazitů; 4+ = 10³ – 10⁴ parazitů; 5+ = 10⁴ – 10⁵ parazitů

Tabulka 4-17: Počet parazitů v jednotlivých tkáních myši BALB/c AnNCrI

		Statistic	
		bezXENO	XENO
Počet parazitů	Mean	32,33	3355,00
	Median	0,00	391,50
	Std. Deviation	54,265	5942,720
	Minimum	0	0
	Maximum	130	14993
	Total N	12	
	Test statistic	29,000	
	p-value	0,093	

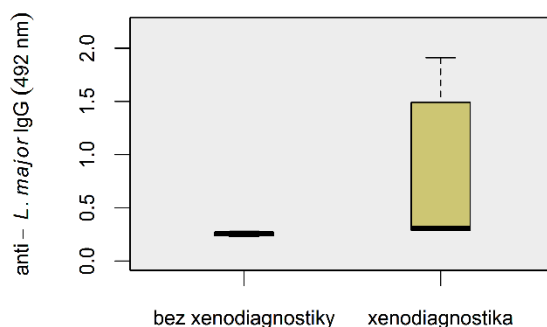
Tabulka 4-18: Počet parazitů v uších myši BALB/c AnNCrI 10. týden p. i.
(Statistický výstup a Mann-Withney U-test)



Obrázek 4-9: Počet parazitů v uších myši BALB/c AnNCrI 10. týden p. i.

		Statistic	
		bezXENO	XENO
anti-L. major IgG	Mean	0,257	0,767
	Median	0,26	0,31
	Std. Deviation	0,02	0,735
	Minimum	0,23	0,29
	Maximum	0,28	1,91
	Total N	12	
	Test statistic	0	
	p-value	0,005	

Tabulka 4-19: Hladina protilátek proti *L. major* u myši BALB/c AnNCrI 10. týden p. i. (Statistický výstup a Mann-Whitney U-test)



Obrázek 4-10: Hladina protilátek proti *L. major* u myši BALB/c AnNCrI 10. týden p. i.

4.2.3 Infektivita hostitelů pro přenašeče *P. duboscqi*

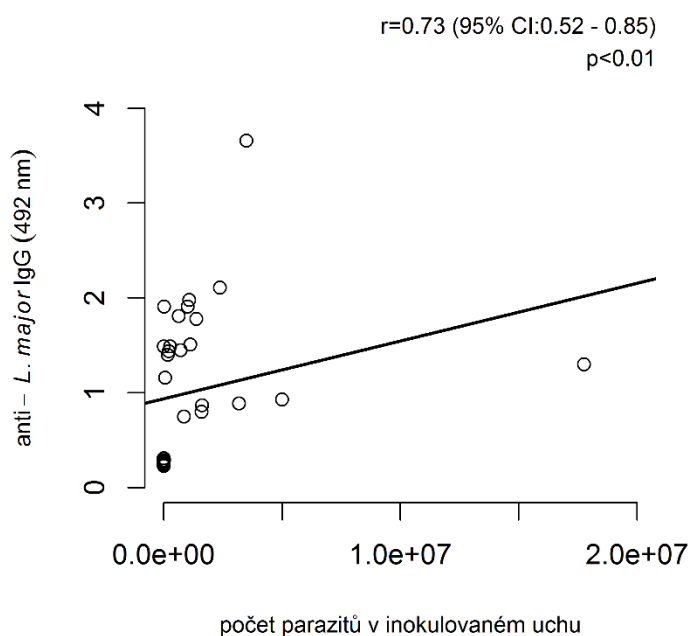
V průběhu deseti týdnů bylo sledováno procento nakažených samic *P. duboscqi*, které měly možnost sát na infikovaném uchu myši kmene BALB/c AnNCrI. V pokusech bylo použito 12 samic myši kmene BALB/c AnNCrI a mikroskopicky vyšetřeno 955 střev nasátých přenašečů *P. duboscqi*. Výsledky pokusu jsou shrnuty v tabulce 4-20. U většiny pitvaných samic s pozitivním výsledkem se jednalo o středně silné infekce (94 % infekcí), kdy leishmanie nekolonizovaly stomodeální valvu (94 % infekcí). Jedinci z XENO1 skupiny se stali infekčními pro flebotomy 4. týden p. i. a jejich infektivita mírně vzrůstala až do 10. týdne p. i. (ve 4. týdnu p. i. 2,21 %, v 6. týdnu p. i. 2,23 %, v 8. týdnu p. i. 3,36 % a v 10. týdnu p. i. 3,97 %). Skupina bezXENO byla testována pouze 10. týden p. i., ani jeden ze 195 vypitvaných flebotomů se nenakazil sáním krve z infikovaného ucha.

týden PBM	skupina	Myš	<i>P. duboscqi</i>			
			N sálo	pitváno	pozitivní	% pozitivních
2	Skupina XENO1	A1	50	23	0	0,00
		B1	48	25	0	0,00
		C1	55	31	0	0,00
		D1	36	14	0	0,00
		E1	45	24	0	0,00
		F1	53	28	0	0,00
		Σ	287	145	0	0,00
4	Skupina XENO1	A1	42	27	0	0,00
		B1	43	22	0	0,00
		C1	39	18	1	5,56
		D1	41	24	0	0,00
		E1	36	18	0	0,00
		F1	42	27	2	7,41
		Σ	243	136	3	2,21
6	Skupina XENO1	A1	55	32	0	0,00
		B1	52	27	1	3,70
		C1	54	33	2	6,06
		D1	46	28	0	0,00
		E1	48	30	0	0,00
		F1	50	29	1	3,45
		Σ	305	179	4	2,23
8	Skupina XENO1	A1	44	20	0	0,00
		B1	52	31	1	3,23
		C1	48	28	1	3,57
		D1	49	24	1	4,17
		E1	51	26	1	3,85
		F1	45	20	1	5,00
		Σ	289	149	5	3,36
10	Skupina XENO1	A1	51	32	0	0,00
		B1	49	23	2	8,70
		C1	48	20	1	5,00
		D1	45	19	2	10,53
		E1	52	26	0	0,00
		F1	47	31	1	3,23
		Σ	292	151	6	3,97
	Skupina bezXENO	A2	52	38	0	0,00
		B2	54	36	0	0,00
		C2	50	31	0	0,00
		D2	51	29	0	0,00
		E2	50	25	0	0,00
		F2	47	36	0	0,00
		Σ	304	195	0	0,00

Tabulka 4-20: Xenodiagnostické pokusy na infikovaném uchu myší BALB/c AnNCrl

4.3 Korelační analýza protilátkové imunitní odpovědi proti *L. major* a množství parazitů

Pomocí metody ELISA byla u jednotlivých linií BALB/c myší stanovena hladina protilátek proti *L. major* ze séra získaného 10. týden po infekci. U obou linií BALB/c byl prokázán signifikantní rozdíl v hladině protilátek mezi skupinami XENO a bezXENO (kapitoly 4.1.2 a 4.2.2). Pomocí korelační analýzy (obrázek 4-11) byla prokázána pozitivní závislost u myší BALB/c mezi počtem parazitů v inokulovaném uchu, který byl stanoven 10. týden p. i. metodou PCR, a hladinou protilátek proti *L. major*, měřenou 10. týden p. i. metodou ELISA. Korelační koeficient (r) byl 0,73 ($P < 0,01$).

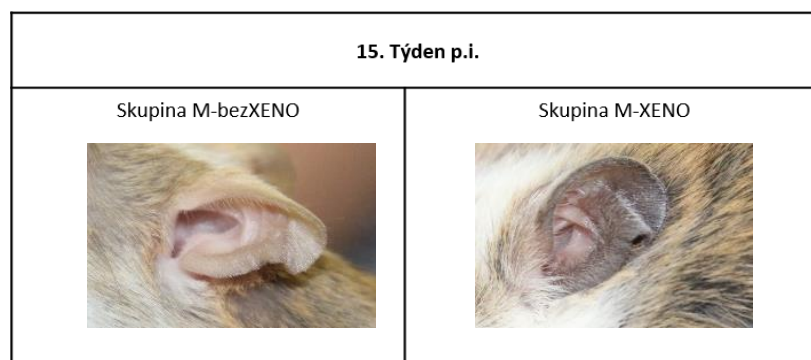


Obrázek 4-11: Korelační analýza počtu parazitů v inokulovaném uchu a hladiny protilátek proti *L. major*

4.4 Pokusy s hlodavci *Mastomys natalensis*

4.4.1 Průběh infekce: Vnější manifestace onemocnění a distribuce parazitů v těle hostitelů

Celkem 13 hlodavců bylo infikováno *L. major* společně s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, každý týden byla zaznamenána jejich hmotnost a kontrolován případný vznik lézí na infikovaném uchu. V týdnech 10, 15, 20 a 35 po infekci byly vždy tkáně ze dvou samic (35. týden pouze jedna) *M. natalensis* ze skupiny M-bezXENO otestovány na přítomnost leishmanií pomocí metody qPCR. Tkáně jedinců ze skupiny M-XENO byly testovány až na konci XD pokusů, tedy 35. týden p. i. Navíc byly části tkání ze sleziny a jater všech hlodavců kultivovány na krevním agaru. Ani jedno zvíře nevykazovalo během celého experimentu žádné viditelné příznaky onemocnění, jako je signifikantní úbytek hmotnosti nebo tvorba lézí (obrázek 4-12), ani pomocí kultivace jsme nezachytili žádné leishmanie. Pomocí qPCR byla přítomnost *L. major* detekována pouze v uších 3 hlodavců ze skupiny M-bezXENO a hodnoty se pohybovaly na hranici detekce (tabulka 4-21). V případě M-XENO skupiny se výsledky také pohybovaly na hranici detekce, kromě uší byli paraziti detekováni i v předních tlapkách a játrech (tabulka 4-22).



Obrázek 4-12: Fotografie uší hlodavců *Mastomys natalensis* 15. týdnu p. i.

Tkáň	Skupina M-bezXENO						
	MA1	MB1	MC1	MD1	ME1	MF1	MG1
krev	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
pravé ucho	neg.	neg.	+	+	neg.	+	neg.
levé ucho	neg.	neg.	neg.	+	neg.	+	neg.
pravá uzlina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
levá uzlina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
přední tlapky	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
zadní tlapky	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
ocas	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
slezina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
játra	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

neg. = negativní; + = < 10 parazitů; MA1, MB1 = hlodavci usmrceni 10. týden p. i.; MC1, MD1 = hlodavci usmrceni 15. týden p. i.; ME1, MF1 = hlodavci usmrceni 20. týden p. i.; MF1 = hlodavec usmrcen 35. týden p. i.

Tabulka 4-21: Počet parazitů v jednotlivých tkáních hlodavců *M. natalensis* (M-bezXENO skupina)

Tkáň	Skupina M-XENO					
	MA2	MB2	MC2	MD2	ME2	MF2
krev	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
pravé ucho	neg.	+	neg.	neg.	neg.	neg.
levé ucho	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	+
pravá uzlina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
levá uzlina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
přední tlapky	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
zadní tlapky	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
ocas	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
slezina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
játra	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	+

neg. = negativní; + = < 10 parazitů

Tabulka 4-22: Počet parazitů v jednotlivých tkáních hlodavců *M. natalensis*

4.4.2 Infektivita hostitelů pro přenašeče *P. duboscqi*

Všech šest samic *M. natalensis* ze skupiny M-XENO bylo vystaveno sání flebotomů na infikovaném uchu v týdnu 2, 5, 15 a 20 po infekci. Všech 638 nasátých samic *P. duboscqi* bylo osmý den po sání vypitváno a obsah střev vyšetřen mikroskopicky na přítomnost leishmanií. Ani jedna samice *P. duboscqi* se v průběhu 20 týdnů od infekce nenakazila sáním na infikovaném hlodavci. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4-2.

týden PBM	skupina	Myš	<i>P. duboscqi</i>			
			N sálo	pitváno	pozitivní	% pozitivních
2	Skupina M-XENO1	MA1	25	17	0	0
		MB1	31	12	0	0
		MC1	37	31	0	0
		MD1	30	18	0	0
		ME1	26	22	0	0
		MF1	36	26	0	0
		Σ	185	126	0	0
5	Skupina M-XENO1	MA1	26	20	0	0
		MB1	19	15	0	0
		MC1	38	27	0	0
		MD1	39	36	0	0
		ME1	29	21	0	0
		MF1	13	11	0	0
		Σ	164	130	0	0
10	Skupina M-XENO1	MA1	24	19	0	0
		MB1	49	34	0	0
		MC1	20	17	0	0
		MD1	38	28	0	0
		ME1	59	41	0	0
		MF1	40	27	0	0
		Σ	230	166	0	0
15	Skupina M-XENO1	MA1	57	38	0	0
		MB1	22	19	0	0
		MC1	36	24	0	0
		MD1	35	30	0	0
		ME1	31	24	0	0
		MF1	29	15	0	0
		Σ	210	150	0	0
20	Skupina M-XENO1	MA1	32	23	0	0
		MB1	18	16	0	0
		MC1	22	17	0	0
		MD1	0	0	0	0
		ME1	9	6	0	0
		MF1	8	4	0	0
		Σ	89	66	0	0

Tabulka 4-23: Xenodiagnostické pokusy na infikovaném uchu hlodavců *M. natalensis*

4.4.3 Přenosové pokusy

Samice *P. duboscqi* byly experimentálně nakaženy *L. major* sáním přes membránu na heparinizované krvi obsahující 10^6 promastigotů/ml. Po defekaci (10.-11. den po sání) jim bylo umožněno sát na naivních hostitelích – 4 samicích a 4 samcích *M. natalensis*. Samice flebotomů byly bezprostředně po sání odchyceny a metodou qPCR bylo určeno množství parazitů

v jejich střevě. Po 5, 10, 15, 20 a 25 týdnech od sání nakažených samic byli tito hostitelé vystaveni sání nenakažených samic *P. duboscqi*. Ani u jedné z celkem 1120 vypitvaných nasátých samic nebyly nalezeny leishmanie v zažívacím traktu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4-24.

týden PBM	Mastomys	<i>P. duboscqi</i> samice			
		N sálo	pitváno	pozitivní	% pozitivních
5	MZ	30	28	0	0,00
	MY	29	26	0	0,00
	MX	30	29	0	0,00
	MW	30	30	0	0,00
	MV	28	26	0	0,00
	MU	30	30	0	0,00
	MT	30	26	0	0,00
	MS	30	29	0	0,00
10	MZ	30	29	0	0,00
	MY	30	30	0	0,00
	MX	29	26	0	0,00
	MW	30	26	0	0,00
	MV	30	29	0	0,00
	MU	27	26	0	0,00
	MT	30	30	0	0,00
	MS	29	26	0	0,00
15	MZ	29	26	0	0,00
	MY	28	28	0	0,00
	MX	30	28	0	0,00
	MW	30	29	0	0,00
	MV	30	28	0	0,00
	MU	30	28	0	0,00
	MT	30	25	0	0,00
	MS	30	30	0	0,00
20	MZ	30	30	0	0,00
	MY	30	27	0	0,00
	MX	30	28	0	0,00
	MW	30	30	0	0,00
	MV	30	29	0	0,00
	MU	30	26	0	0,00
	MT	30	30	0	0,00
	MS	30	30	0	0,00
25	MZ	31	31	0	0,00
	MY	30	30	0	0,00
	MX	29	26	0	0,00
	MW	29	26	0	0,00
	MV	30	28	0	0,00
	MU	30	25	0	0,00
	MT	28	28	0	0,00
	MS	30	28	0	0,00

Tabulka 4-24: Přenosové pokusy s hlodavci *M. natalensis*

5 DISKUZE

K vytvoření laboratorního modelu pro studium leishmaniózy a infekcí *L. major* byly v této práci použity myši kmene BALB/c, které jsou vysoce vnímavé k infekci *L. major*. Dochází u nich k polarizaci imunitní odpovědi k Th2, což posléze vede k progresivnímu systémovému onemocnění (Heinzel *et al.* 1989). Imunitní odpověď typu Th2 označuje formu imunitní reakce, kdy T-lymfocyty produkují specifické cytokiny (IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13) a aktivují tím B-lymfocyty, ty jsou zodpovědné za specifickou, protilátkami zprostředkovanou odpověď, která je neúčinná proti vnitrobuněčným parazitům (Scott & Novais, 2016).

Rozvoj infekce leishmanií v hostiteli je proces, který ovlivňuje mnoho faktorů. Důležitou roli tu bezesporu hraje druhově specifická genetická náchylnost k danému infekčnímu onemocnění (Lipoldová & Demant, 2006), ale projevy onemocnění laboratorních zvířat ovlivňuje i experimentální uspořádání: hlavně způsob infekce (nejčastěji intradermální nebo intravenózní inokulace) a velikost a typ inokula (procyklické nebo metacyklické formy promastigotů či amastigoti). Pokud je kožní leishmanióza iniciována přímo sáním flebotoma, tak dochází u rezistentních kmenů myší k samovolnému vyhojení lézí jako u lidských onemocnění (Rogers *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008). U vnímavých BALB/c myší se ovšem vyvíjí progresivní onemocnění, charakterizované nehojící se lézí v místě vpichu a postupnou diseminací parazitů do vnitřních orgánů, vzniká tedy typ onemocnění pozorovaný u HIV-pozitivních lidí (Th2 imunitní odpověď) (Sinha *et al.* 2005). Naopak v případě intravenózního nebo subdermálního způsobu infekce dochází i v případě *L. major* k rychlé visceralizaci u myší BALB/c (McCall *et al.*, 2013).

Intradermální cesta nákazy, použitá i v našich pokusech, je nejblíže k přirozenému způsobu přenosu, protože paraziti jsou vystaveni lokální imunitní odpovědi v kůži (Belkaid *et al.*, 2000). *Leishmanie* pro inokulaci jsme získali z thorakálních částí mesenteronu nakažených flebotomů, což je místo, kde se akumuluje infekční metacyklické formy parazita a kde je tvořen PSG. Inokulát obsahoval i homogenát slinných žláz *P. duboscqi*. Tak bylo možné napodobit přirozený přenos parazita pomocí přenašeče a zároveň kontrolovat místo vpichu a počet inokulovaných parazitů. Tento standardizovaný postup vyvolal u BALB/c myší symptomatický průběh onemocnění, jak jsme očekávali.

Vývoj onemocnění také výrazně ovlivňuje velikost inokula *L. major* (Kimblin *et al.*, 2008). V našich experimentech tvořila infekční dávka $7,4-8,5 \times 10^4$ *L. major* na myš, tedy byla výrazně nižší, než jsou běžně používané počty leishmanií při injekčním podání (10^6-10^9 leishmanií/myš) (Garg & Dube, 2006). Velikost inokula nepřekročila horní hranici počtu přirozeně přenesených parazitů *L. major* do hostitele během sání *P. duboscqi* (1×10^5) popsané v pokusech Kimblin *et al.* (2008). Infekční dávka obsahovala 65-72 % metacyklických forem promastigotů, tedy infekčních stádií přizpůsobených k přežití v nehostinných podmínkách savčího těla (Sacks 1989; Rogers *et al.*, 2004). Procentuální zastoupení metacyklů v naší infekční dávce odpovídá procentu metacyklů získaných při xenodiagnostických pokusech z *P. orientalis* nakažených *L. donovani* (65-73 %) (Sádlová *et al.*, 2015) a také průměrné hodnotě zastoupení metacyklů *L. infantum* a *L. donovani* při přenosech *Lutzomyia longipalpis* (Aslan *et al.*, 2013).

Změna hmotnosti u myši kmene BALB/c není dobrým ukazatel onemocnění *L. major* (Paul *et al.*, 1998), což bylo potvrzeno i našimi pokusy. Používá se jen jako ukazatel vzniku kolitidy u myši při testování léků proti leishmaniózám (Xu *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 1993; Fournet *et al.*, 1994). Naopak v případě diagnostiky a kontroly viscerální leishmaniózy (*L. donovani* a *L. infantum*) je snížení hmotnosti u nakažených jedinců důležitým příznakem onemocnění (Ciaramella *et al.*, 1997) a to i v případě malých hostitelů, jako je například *Mesocricetus auratus* (Maes *et al.*, 2004; Melby *et al.*, 2001). Naopak protilátky proti leishmaniím produkované hostitelem neposkytují ochranu proti onemocnění, ale jsou dobrým ukazatelem akutní fáze leishmaniózy (rozvoje infekce) (Miles *et al.*, 2005). S tímto tvrzením se shodují i naše výsledky, kde množství protilátek pozitivně korelovalo s množstvím leishmanií v inokulovaném uchu, podobné výsledky byly popsány i ve studii Rohoušová *et al.* (2011).

Myši BALB/c OlaHsd inokulované naprosto stejnou infekční dávkou (v rámci jednoho pokusu) se signifikantně lišily v dynamice vzniku a rozvoje lézí a v distribuci parazitů ve vnitřních orgánech podle toho, zda byly vystaveny opakovanému sání přenašečů *P. duboscqi* v průběhu pokusu nebo nikoliv. Rychlejší propuknutí onemocnění a diseminace parazitů do více orgánů v závislosti na sání *P. duboscqi* byly potvrzeny i při pokusech s linií BALB/c AnNCrI. Zaznamenali jsme i rozdíly mezi skupinami hlodavců *Mastomys natalensis* - u jedinců vystavených sání flebotomů se paraziti rozšířili i do tlapek a jater. Je známo, že sliny flebotomů modulují imunitní odpověď proti leishmaniím. Pokud jsou vpraveny do hostitele společně s infekčním inokulem,

podporují přežívání leishmanií v kůži hostitele a zvyšují jejich virulenci (enhancing efekt) (Titus & Ribeiro, 1988; Theodos *et al.*, 1991; Warburg & Saraiva, 1994). Na druhou stranu, preimunizace hostitelů slinami flebotomů má protektivní účinek (Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000; Thiakaki *et al.*, 2005). Doposud nebylo studováno, jaký vliv na rozvoj infekce má vpravení slinných komponentů do těla hostitelů v průběhu onemocnění (tedy situace, kdy flebotomové sají na již infikovaném jedinci). Výsledky této práce naznačují, že dochází k podobnému „enhancing efektu“ jako v případě, kdy jsou sliny vpraveny do hostitele společně s infekční dávkou. V místě sání se zřejmě utváří prostředí vhodné pro přežívání a množení *L. major*, jak už bylo popsáno: Slinné komponenty mají chemotaktický vliv na makrofágy, kteří se stahují do místa vpichu (Zer *et al.*, 2001), inhibují produkci cytokinů vedoucích k Th1 imunitní odpovědi (Hall & Titus, 1995) a inhibují schopnost dendritických buněk prezentovat antigen (Theodos & Titus, 1993). Zda se v případě sání flebotomů na již infikovaném hostiteli uplatňují i nějaké další mechanismy působení produktů slinných žláz je třeba experimentálně ověřit.

Naše pokusy překvapivě ukázaly odlišnosti v manifestaci onemocnění vyvolaného *L. major* u dvou linií inbredních myší BALB/c OlaHsd a BALB/c AnNCrI. U jedinců linie BALB/c AnNCrI nedošlo k progresivnímu rozvoji lézí a ve tkáních bylo detekováno signifikantně méně parazitů než v případě myší BALB/c OlaHsd. Podobná situace byla popsána i ve studii Murray *et al.* (1982), kde myši kmene BALB/c pocházející z Charles River Laboratories nakažené intravenózně *L. donovani* vykazovaly hojící se fenotyp s nízkým množstvím parazitů ve vnitřních orgánech, zatímco u BALB/c myší pocházejících z Jackson laboratories a z Canadian breeders Inc. se vyvinul klasický nehojící se fenotyp. Tyto odlišnosti mohou být způsobeny rozdílným genetickým pozadím v rámci různých linií BALB/c myší. Bylo popsáno, že linie BALB/c myší se liší i ve vnímavosti k dalším infekčním onemocněním (Skamene, 1985; Beaman & Black, 1985; Risser & Kaehler, 1985; Meneses *et al.*, 2009). Uvažovalo se o genech v lokusu LSH, které regulují citlivost k chronickým onemocněním nebo o typu alloantigenů haplotypu H-2, které jsou součástí MHC komplexu (Blackwell *et al.*, 1985). Nejnovější studie však ukazují, že kandidátní gen Nramp1, který je součástí LSH lokusu, nemá vliv na virulenci patogenů v myších (Boechat *et al.*, 2002). Naopak se zdá, že haplotyp H-2 interaguje s cysteinovou proteázou B *L. amazonensis*, která se podílí velkou měrou na interakci mezi hostitelem a parazitem (Brandt *et al.*, 2016).

Všechny experimentálně infikované myši linie BALB/c OlaHsd byly schopné nakazit flebotomy a hodnota infektivit rostla až k 20,1 %. Ke srovnatelným výsledkům dospěly i studie z Brazílie, kde se infektivita symptomatických psů (*L. infantum*) pro přenašeče *Lu. longipalpis* pohybovala mezi 13 % a 28 % (Michalsky *et al.*, 2007; Orin Courtenay *et al.*, 2002; B. Travi *et al.*, 2001) nebo studie Sádlová *et al.* (2015), kde infektivita BALB/c myši infikovaných *L. donovani* pro přenašeče *P. orientalis* činila 19 %. Naopak infektivita myši BALB/c AnNCrI dosahovala v našich pokusech maximálně 4 %. Podobně nízká hodnota infektivit byla popsána i v rámci xenodiagnostických pokusů s krysami (*Rattus rattus*) infikovanými *L. tropica*, kde se procento infikovaných flebotomů druhu *P. sergenti* pohybovalo od 0 % do 7 % v průběhu jednoho roku (Svobodová *et al.*, 2003).

Je pravděpodobné, že nízká infektivita hostitelů pro flebotomy je dána nízkým počtem parazitů v místě sání přenašečů. V našich pokusech se ukázalo, že infektivita myši BALB/c OlaHsd byla vysoká u skupiny vystavené sání flebotomů i u kontrolní skupiny, přičemž u obou skupin bylo v místě inokulace detekováno velké množství parazitů. U myši z linie BALB/c AnNCrI, kde ve skupině nevystavené sání flebotomů bylo parazitů detekováno velmi málo, byla infektivita nulová oproti XENO skupině, kde se infikovala 4 % flebotomů. Pokud se flebotomové nakazili sáním na myši BALB/c AnNCrI s nízkým počtem parazitů v těle, došlo k rozvoji jen střední infekce, kdy paraziti nekolonizovali stomodeální valvu. U *Mastomys natalensis* bylo množství parazitů v těle hostitelů tak nízké, že se nenakazil žádný přenašeč. Tyto výsledky svědčí o tom, že existuje určitá hodnota minimálního množství amastigotů v těle hostitele (respektive v místě sání přenašečů) nezbytná proto, aby se přenašeč dokázal infikovat a infekce se v něm udržela a rozvinula.

Zatím je známo z experimentálních promastigotních infekcí flebotomů, že k vyvinutí infekce v přenašeči stačí jen několik jedinců promastigotů (Pružinová *et al.*, 2015; Šeblová *et al.*, 2013). V případě amastigotních infekcí flebotomů je dynamika vývoje leishmanií jiná než u infekcí iniciovaných promastigoty (Sádlová *et al.*, unpublished). Po nasátí dochází k redukci počtu amastigotů ve střevě flebotomů, jak bylo popsáno např. u *L. mexicana* v *Lu. longipalpis*. Během prvních šesti hodin po nasátí došlo k snížení počtu parazitů ve střevě na 80 % a po 24 hodinách po nasátí dokonce na 66 % (Rogers *et al.*, 2002). Snížení počtu amastigotů o 50 % během prvních čtyř hodin po sání bylo pozorováno i v případě *L. major* ve střevě *P. papatasi*

(Pimenta *et al.*, 1997). Rápidní pokles parazitů v zažívacím traktu flebotomů je připisován působení trávicích proteáz flebotomů (shrnutí v Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012).

Flebotomové jsou schopni sát krev z hostitelů pouze na místech bez silného ochlupení. Proto se i v laboratorních chovech flebotomů často používají holé kmeny laboratorních myší, aby se zvýšilo procento nasátých samic (Volf & Volfová, 2011; Denlinger *et al.*, 2016). Při xenodiagnostických pokusech jsme pozorovali, že samice *P. duboscqi* sají velmi dobře na ušním boltci BALB/c myší i hlodavců *M. natalensis*, ale pokud mají možnost sát na celém těle hostitele, preferují sání na zadních tlapkách a ocasu v porovnání s předními tlapkami a ušima myší. Ochota flebotomů sát na neochlupených částech uší byla opakovaně popsána ve studiích zabývajících se infektivitou psů nakažených *L. infantum* s přenašečem *Lu. Longipalpis* (Soares *et al.*, 2011; Laurenti *et al.*, 2013; Verçosa *et al.*, 2008). V těchto studiích však flebotomové neměli na výběr jiné části těla. Podobné výsledky jako v našich experimentech jsou popisovány i ve studii Svobodová *et al.* (2006), kde *P. arabicus* měli možnost sát na přední části těla *Pro-cavia capensis*. Většina flebotomů sála na nose a horním rtu damanů a ignorovala sání na uších a předních končetinách. Na druhou stranu *L. major* byla detekována ve většině případů hlavně z uší a sleziny odchycených hlodavců *Psammomys obesus* a *Meriones shawi* z volné přírody (Githure *et al.*, 1986; Ghawar *et al.*, 2011), ale i v ocasu a končetinách hlodavců *Tatera sp.* byli detekováni paraziti *L. major* v nízkém počtu (Mehrabani *et al.*, 2007). Predilekční místa leishmanií se tak mohou lišit v závislosti na druhu hostitele nebo druhu přenašeče.

V druhé části diplomové práce jsme se snažili ověřit hypotézu, zda hlodavci *Mastomys natalensis* hrají důležitou roli v koloběhu *L. major* v subsaharské Africe. Hlodavci *M. natalensis* splňují hned několik kritérií nezbytných pro rezervoárové hostitele leishmaniózy. Jedná se druh s rozsáhlým areálem rozšíření, zahrnujícím téměř celou subsaharskou Afriku. Obývá široké spektrum habitatů nejčastěji v těsné blízkosti lidských sídel (Kingdon *et al.*, 2013). Jedná se o hlodavce s převážně noční aktivitou, kteří se v zajetí dožívají až pěti let (Fox, 2015). V přírodních podmínkách představuje *M. natalensis* často nejpočetnější druh hlodavce na sledovaných lokalitách (Leirs, 1995; Happold & Happold, 1991). Tyto ekologické vlastnosti dělají z druhu *M. natalensis* ideálního kandidáta na rezervoárového hostitele leishmaniózy. V dřívějších studiích byla v jejich tkáních opakovaně nalezena *L. major* a prevalence se pohybovala okolo 8 % (Dedet *et al.*, 1979; Githure *et al.*, 1986; Ashford, 1996; Ashford, 2000). Také jsme

potvrdili, že na těchto hlodavcích ochotně sají samice *P. duboscqi*, nejčastější přenašeči *L. major* v subsaharské Africe (Killick-Kendrick, 1999) a experimentálně nakažení hlodavci nevykazují v průběhu pokusu žádné viditelné známky onemocnění (změna hmotnosti nebo vznik lézí), i když v jejich tkáních byli paraziti detekováni pomocí qPCR. Bohužel kvantita parazitů byla příliš malá a infektivita těchto hostitelů nebyla prokázána, protože ani jeden ze stovek vyšetřených flebotomů se nenakazil sáním na inokulovaném uchu *M. natalensis*.

Z uvedených výsledků vyplývá, že *Mastomys natalensis* by mohla hrát spíše roli náhodného hostitele v koloběhu kožní leishmaniózy. Jedná se o hostitele, který se může nakazit *L. major*, ale infekci dále nepřenáší. Naši hypotézu je nutné potvrdit dalšími experimenty, například s použitím odlišných izolátů *L. major*, než který byl použit v našich pokusech, nejlépe s izolátem přímo ze subsaharské Afriky.

6 SHRNUTÍ

- V rámci této diplomové práce byl vytvořen laboratorní model pro studium xenodiagnostiky *L. major* v inbredních myších kmene BALB/c.
- Bylo zjištěno, že změna hmotnosti není dobrým ukazatelem průběhu onemocnění u myší kmene BALB/c nakažených *L. major*. Hmotnost signifikantně rostla se stářím myší, ale rozdíl mezi pokusnými skupinami a kontrolními zvířaty nebyl patrný. Naopak tvorba IgG proti látkám proti *L. major* dobře koreluje s počtem parazitů v těle hostitelů a je dobrým ukazatelem míry nákazy.
- Sání přenašečů *P. duboscqi* na myších kmene BALB/c OlaHsd nakažených *L. major* mělo velký vliv na vznik a dynamiku rozvoje lézí v průběhu pokusu. Opakované sání flebotomů mělo vliv i na diseminaci parazitů do různých tkání hostitele. Myším vystaveným xenodiagnostickým pokusům se léze vytvořily v průměru o týden dříve a na konci pokusu byly v průměru o 3,5 mm větší než léze u skupiny, na které se xenodiagnostika neprováděla. U této skupiny také paraziti diseminovali i do předních a zadních končetin.
- Přestože u myší kmene BALB/c OlaHsd testovaných pomocí xenodiagnostiky byly v průměru vyšší i počty parazitů v místě inokulace, rozdíl oproti skupině nevystavené sání flebotomů nebyl signifikantní, signifikantně se nelišila ani infektivita pro flebotomy.
- Sání *P. duboscqi* na myších kmene BALB/c AnNCrI zvýšilo projevy infekce (tvorba nodulů a lézí) i infektivitu pro flebotomy (4 % versus 0 % u kontrolní skupiny).
- Naše pokusy poukázaly na odlišnosti v manifestaci onemocnění a infektivitě pro přenašeče u dvou linií inbredních myší BALB/c OlaHsd a BALB/c AnNCrI. U myší kmene BALB/c OlaHsd se tvořily v průměru větší léze (až 10 mm) a byly pro přenašeče infekční již 2. týden po infekci, infektivita dosáhla až 20,1 %. Naopak v případě myší kmene BALB/c AnNCrI se vyvinuly jen malé léze (do 2 mm), které se průměrně 6. týden po infekci uzavřely v noduly.

Myši byly pro přenašeče infekční až 4. týden po infekci a nejvyšší hodnota infekitivity pro *P. duboscqi* činila 3,97 %.

- Výše zmíněný laboratorní model jsme aplikovali na hlodavce druhu *Mastomys natalensis*, potencionální rezervoárové zvíře leishmaniózy v subsaharské Africe. Experimentálně nakažení hlodavci *M. natalensis* parazitem *L. major* v průběhu 35 týdnů od infekce nevykazovali žádné viditelné známky onemocnění, i když paraziti byli detekováni v nízkém počtu ve čtyřech typech tkání.
- Pomocí xenodiagnostiky jsme testovali infektivitu *M. natalensis* pro *P. duboscqi*, ani jeden z 638 vyšetřených flebotomů se nenakazil sáním z inokulovaného ucha. Nenakazili se ani flebotomové sající na zvířatech vystavených předtím sání infikovaných flebotomů. Na základě výsledků nemůžeme potvrdit roli hlodavců rodu *Mastomys natalensis* jako rezervoárových hostitelů *L. major*.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Addy, M. & Nandy, A.**, (1992). Ten years of kala-azar in west Bengal, Part I. Did post-kala-azar dermal leishmaniasis initiate the outbreak in 24-Parganas? *Bulletin of the World Health Organization*, p. 341.
- Ahmed, S., Chelbi, I. & Kaabi, B.**, (2010). Differences in the salivary effects of wild-caught versus colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the development of zoonotic cutaneous. *Journal of medical*, pp. 74-79.
- Akhavan, A. A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M. H., Rassi, Y., Bates, P., .. & Jalali-zand, N.** (2010). *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Experimental parasitology*, pp. 552-556.
- Aliaga, L., Cobo, F., Mediavilla, J. D., Bravo, J., Osuna, A., Amador, J. M., .. & Navarro, J. M.** (2003). Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine*, pp. 147-158.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J.** (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, pp. 1-88.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., .. & Moreno, J.**, (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 298-319.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., .. & WHO Leishmaniasis Control Team**, (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its incidence. *American PLoS one*, p. e35671.
- de Amorim, I. F. G., da Silva, S. M., Figueiredo, M. M., Moura, E. P., de Castro, R. S., de Souza Lima, T. K., .. & Tafuri, W. L.** (2011). Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. *PloS one*, p. e27679.
- Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., & Sacks, D.** (2007). CD4+ CD25– Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, pp. 285-297.

- Anderson, R., May, R. & Anderson, B.,** (1992). Infectious diseases of humans: dynamics and control., *Oxford: Oxford university press*, pp. 1-3.
- Ashford, A. W.,** (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*, pp. 1269-1281.
- Ashford, A. W.,** (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*, pp. 523-532.
- Aslan, H., Dey, R. & Meneses, C.,** (2013). A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector. *Journal of Infectious*, p. 932.
- Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., & Olivier, M.** (2015). Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly mid-gut. *Cell reports*, pp. 957-967.
- Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., .. & Johnson, W. D.** (1986). New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, pp. 1003-1011.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D. & Grimaldi, J.,** (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American journal*, pp. 536-546.
- Bates, P. A.,** (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, pp. 1097-1106.
- Beaman, B. & Black, C.,** (1985). Interaction of *Nocardia asteroides* in BALB/c mice: modulation of macrophage function, enzyme activity and the induction of immunologically specific T-cell bactericidal. *The BALB/c Mouse, Springer Berlin Heidelberg*, pp. 138-147.
- Belazzoug S.,** (1983). Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p. 876.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., & Sacks, D.** (2000), A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "Silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*, pp. 969-977.

- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., & Sacks, D. L.** (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, pp. 502-507.
- Belkaid, Y., Hoffmann, K. F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M. C., Wynn, T. A., & Sacks, D. L.** (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of experimental medicine*, pp. 1497-1506.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., .. & Sacks, D. L.** (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of experimental medicine*, pp. 1941-1953.
- Blackwell, J. M., Roberts, B., & Alexander, J.** (1985). Response of BALB/c mice to leishmanial infection. *The BALB/c Mouse Springer Berlin Heidelberg*, pp. 97-106.
- Blancq, S. Le & Peters, W.,** (1986). *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani* sensu lato zymodemes. *The journal of the Royal Society of Tropical*, pp. 367-377.
- Boechat, N., Lagier-Roger, B., Petit, S., Bordat, Y., Rauzier, J., Hance, A. J., .. & Reyrat, J. M.,** (2002). Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in *Mycobacterium tuberculosis* does not affect virulence in mice. *Infection and immunity*, pp. 4124-4131.
- Bongiorno, G., Paparcone, R., Manzillo, V. F., Oliva, G., Cuisinier, A. M., & Gradoni, L.,** (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary parasitology*, pp. 691-695.
- Brandt, A. M., Batista, P. R., Souza-Silva, F., Alves, C. R., & Caffarena, E. R.,** (2016). Exploring the unbinding of *Leishmania (L.) amazonensis* CPB derived-epitopes from H2 MHC class I proteins. *Proteins*, pp. 473-487.
- Bronfen, E., Dias, J. & Gouveia, S.,** (1984). Infecção experimental de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (Silva e Nussenzweig, 1953). *Revista de Patologia Tropical*, pp. 1-7.

- Castro, C., Santos, M. C. A., & Silveira, C. A.,** (2004). Comparative study between artificial xenodiagnosis performed immediately and four hours after venous punch. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, pp. 128-130.
- Cerqueira, E. J. L., Sherlock, I., Gusmão, A., Junior, B., de Almeida, A., & Nakatani, M.** (2003). Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, pp. 695-701.
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., .. & Persechino, A.** (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, pp. 539-543.
- Costa, C., Gomes, R. & Silva, M.,** (2000). Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *Journal of Infectious*, pp. 997-1000.
- Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Shaw, J. J., & Dye, C.** (2002). Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs : Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *Oxfords journals*, pp. 1314-1320.
- Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., & Dye, C.,** (2002). Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*, pp. 407-414.
- Deane, L.M. & Deane, M.P.,** (1955). Preliminary observation on the comparative importance of man, the dog and fox as reservoirs of *Leishmania donovani*, in endemic area for calazar, Ceara. *O Hospital*, pp. 79-98.
- Dedet, J. P., Derouin, F., Hubert, B., Schnur, L. F., & Chance, M. L.,** (1979). Isolation of *Leishmania major* from *Mastomys erythroleucus* and *Tatera gambiana* in Senegal (West Africa). *Annals of Tropical*, pp. 433-437.
- Denlinger, D. S., Li, A. Y., Durham, S. L., Lawyer, P. G., Anderson, J. L., & Bernhardt, S. A.,** (2016). Comparison of In Vivo and In Vitro Methods for Blood Feeding of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory. *Journal of Medical Entomology*, pp. 74-82.
- Desjeux, P.,** (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, pp. 305-318.

- Dias, E.**, (1940). Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 335-342.
- Dostálová, A. & Volf, P.**, (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, p. 1.
- Drapier, J. & Wietzerbin, J.**, (1988). Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *European journal of immunology*, pp. 1587-1592.
- Dubrovsky, Y.**, (1979). Biology of great gerbil-the principal carrier of the great of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. *WHO Traveling Seminar on Leishmaniasis Control. Ministry of Health, Moscow*, pp. 113-122.
- Ehrchen, J. M., Roth, J., Roebrock, K., Varga, G., Domschke, W., Newberry, R., .. & Spahn, T. W.**, (2008). The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to Leishmania major infection in mice. *Infection and immunity*, pp. 4241-4250.
- El-Hassan, A. M., Meredith, S. E. O., Yagi, H. I., Khalil, E. A. G., Ghalib, H. W., Abbas, K., .. & Ismail, A.** (1995). Sudanese mucosal leishmaniasis: epidemiology, clinical features, diagnosis, immune responses and treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 647-652.
- Elnaiem, D. A., Hassan, M. M., Maingon, R., Nureldin, G. H., Mekawi, A. M., Miles, M., & Ward, R. D.** (2001). The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology*, pp. 531-536.
- Evans, T. G., Thai, L., Granger, D. L., & Hibbs, J. B.** (1993). Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *The Journal of immunology*, pp. 907-915.
- Fichet-Calvet, E., Jomaa, I., Ben Ismail, R., & Ashford, R. W.** (2003). *Leishmania major* infection in the fat sand rat *Psammomys obesus* in Tunisia: interaction of host and parasite populations. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, pp. 593-603.
- Fournet, A., Gantier, J. C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M. H., Mayrargue, J., .. & Hocquemiller, R.** (1994). The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, pp. 537-544.

- Fox, J. G.** (2015). *Laboratory animal medicine*. L. C. Anderson, G. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.). Elsevier.
- Garg, R., & Dube, A.** (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, p. 439.
- Gebre-Michael, T., Pratlong, F., & Lane, R. P.** (1993). *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* (Diptera: Phlebotominae), naturally infected with *Leishmania major* in southern Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 10-11.
- Ghawar, W., Toumi, A., Snoussi, M. A., Chlif, S., Zâatour, A., Boukthir, A., .. & Ben-Salah, A.** (2011). *Leishmania major* infection among *Psammomys obesus* and *Meriones shawi*: reservoirs of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Sidi Bouzid (central Tunisia). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, pp. 1561-1568.
- Githure, J. I., Schnur, L. F., Le Blancq, S. M., & Hendricks, L. D.** (1986). Characterization of Kenyan *Leishmania spp.* and identification of *Mastomys natalensis*, *Taterillus emini* and *Aethomys kaiseri* as new hosts of *Leishmania major*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, pp. 501-507.
- Gomes, R. B., Mendonça, I. L., Silva, V. C., Ruas, J., Silva, M. B., Cruz, M. S., .. & Costa, C. H.** (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 127-133.
- Gradoni, L. & Pozio, E.**, (1983). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, pp. 427-431.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L.**, (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International journal for parasitology*, pp. 1169-1180.
- Guarga, J. L., Lucientes, J., Peribáñez, M. A., Molina, R., Gracia, M. J., & Castillo, J. A.**, (2000). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta tropica*, pp. 203-207.
- Hall, L. R., & Titus, R. G.**, (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, pp. 3501-3506.

- Happold, D. & Happold, M.,** (1991). An ecological study of small rodents in the thicket-clump savanna of Lengwe National Park, Malawi. *Journal of Zoology*, pp. 527-547.
- Hassani, K., Shio, M. T., Martel, C., Faubert, D., & Olivier, M.** (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. *PloS one*, p. e95007.
- Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H., & Laurensen, M. K.** (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, pp. 1468-1473.
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M.,** (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, pp. 59-72.
- Himmelrich, H., Launois, P., Maillard, I., Biedermann, T., Tacchini-Cottier, F., Locksley, R. M., .. & Louis, J. A.** (2000). In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *The Journal of Immunology*, pp. 4819-4825.
- Holm, Å., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., & Rasmusson, B.,** (2001). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cellular microbiology*, pp. 439-447.
- Chance, M. L., Schnur, L. F., Thomas, S. C., & Peters, W.,** (1978). The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, pp. 533-542.
- Jones, T. C., Johnson, W. D., Barretto, A. C., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., .. & Wiese, K.,** (1987). Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis* brasiliensis. *Journal of Infectious Diseases*, pp. 73-83.
- Julia, V., Rassoulzadegan, M. & Glaichenhaus, N.,** (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*, pp. 421-423.

- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., & Sacks, D.** (2000). Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. *Science*, pp. 1351-1354.
- Kassahun, A., Sádlova, J., Dvořák, V., Košťálová, T., Rohoušová, I., Frynta, D., .. & Baneth, G.,** (2015). Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta tropica*, pp. 39-44.
- Kassiri, H., Javadian, E. & Abdigoudarzi, M.,** (2011). Natural Leishmania Infection in *Meriones hurrianae* and *Tatera indica* (Rodentia: Cricetidae: Gerbillinae) in Sistan-Baluchistan Province, South–Eastern of Iran. *Adv Stud Biol*, pp. 247-256.
- Kharfi, M., Fazaa, B., Chaker, E., & Kamoun, M. R.,** (2003). Mucosal localization of leishmaniasis in Tunisia: 5 cases. In *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, pp. 27-30.
- Killick-Kendrick R,** (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, pp. 279-289.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., .. & Sacks, D.,** (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 10125-10130.
- Kingdon, J., Happold, D., Butynski, T., Hoffmann, M., Happold, M., & Kalina, J.,** (2013). *Mammals of Africa* (Vol. 1). A&C Black.
- Lainson, R., Dye, C., Shaw, J. J., Macdonald, D. W., Courtenay, O., Souza, A. A., & Silveira, F. T.,** (1990). Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 135-137.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G. & Solbach, W.,** (2003). Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, pp. 210-214.

- Laurenti, M. D., Rossi, C. N., da Matta, V. L. R., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Secundo, N. F. C., .. & Marcondes, M.,** (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary parasitology*, pp. 296-300.
- Leirs, H.,** (1995). Population ecology of *Mastomys natalensis* (Smith, 1834). Implications for rodent control in Africa, *Publications Agricoles (Belgium)*, pp. 1-3.
- Leštinová, T., Vlková, M., Votýpka, J., Volf, P., & Rohoušová, I.,** (2015). *Phlebotomus papatasi* exposure cross-protects mice against *Leishmania major* co-inoculated with *Phlebotomus duboscqi* salivary gland homogenate. *Acta Tropica*, pp. 9-18.
- Liew, F. Y., Wei, X. Q., & Proudfoot, L.** (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, pp. 1311-1315.
- Lipoldová, M. & Demant, P.,** (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, pp. 294-305.
- Lukeš, J., Mauricio, I. L., Schönián, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., .. & Haralambous, C.,** (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 9375-9380.
- Maes, L., Germonprez, N., Quirijnen, L., Van Puyvelde, L., Cos, P., & Berghe, D. V.,** (2004). Comparative Activities of the Triterpene Saponin Maesabalide III and Liposomal Amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in Hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2056-2060.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., & Gramiccia, M.,** (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, pp. 357-60.
- Marsden, P. D.,** (1986). Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 859-876.
- Martin, E.** (2015). *Concise colour medical dictionary*. Oxford University Press.

- Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R., & Titus, R. G.,** (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of immunology*, pp. 5571-5577.
- McCall, L. I., Zhang, W. W., & Matlashewski, G,** (2013). Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease C. E. Chitnis, ed. *PLoS Pathogens*, p. e1003053.
- McConville, M. & Blackwell, J.,** (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 15170-15179.
- McConville, M. J., & Ferguson, M. A.** (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal*, p. 305.
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R.,** (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM : Monthly journal of the Association of Physicians*, pp. 7-14.
- Mehrabani, D., Motazedian, M. H., Oryan, A., Asgari, Q., Hatam, G. R., & Karamian, M.,** (2007). A search for the rodent hosts of *Leishmania major* in the Larestan region of southern Iran: demonstration of the parasite in *Tatera indica* and *Gerbillus* sp., by microscopy, culture and PCR D. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, pp. 1-9.
- Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W., & Coe, J. E.,** (2001). The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. *The Journal of Immunology*, pp. 1912-1920.
- Meneses, G., Berzunza, M., Becker, I., Bobes, R. J., Rosas, G., Sciutto, E., & Fragoso, G.,** (2009). *Taenia crassiceps* cysticercosis: variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains. *Experimental parasitology*, pp. 362-368.
- Michalsky, E. M., Rocha, M. F., da Rocha, A. C. V. M., França-Silva, J. C., Pires, M. Q., Oliveira, F. S., .. & Fortes-Dias, C. L.,** (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary parasitology*, pp. 67-76.

- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M., & Mosser, D. M.,** (2005). a role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine*, pp. 747-754.
- Millán, J., Ferroglío, E., & Solano-Gallego, L.,** (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology research*, pp. 2005-2014.
- Moemenbellah-Fard, M. & Kalantari, M.,** (2003). The PCR-based detection of *Leishmania major* infections in *Meriones libycus* (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Annals of tropical*, pp. 811-816.
- Molina, R., Lohse, J. M., Pulido, F., Laguna, F., Lopez-Velez, R., & Alvar, J.,** (1999). Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 51-53.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., .. & Alvar, J.,** (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 491-493.
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., .. & Bernal, J.,** (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology*, pp. 268-271.
- Mollinedo, F., Janssen, H., de la Iglesia-Vicente, J., Villa-Pulgarin, J. A., & Calafat, J.,** (2010). Selective fusion of azurophilic granules with Leishmania-containing phagosomes in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 34528-34536.
- Mondal, D., Gulam, M. & Khan, M.,** (2011). Recent advances in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, pp. 418-422.
- Morsy, T., Khalil, N. & Salama, M.,** (1995). Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, pp. 73-79.
- Mott, K. E., França, J. T., Barrett, T. V., Hoff, R., Oliveira, T. S. D., & Sherlock, Í. A.,** (1980). Cutaneous allergic reactions to *Triatoma infestans* after xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 3-10.

- Mukhopadhyay, A. & Mishra, R.,** (1991). Development of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus argentipes* & *Ph. papatasi* fed on kala-azar patients in Bihar. *The Indian journal of medical*, pp. 152-154.
- Mullis, K.,** (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, pp. 56-61.
- Murray, H.W., Masur, H. & Keithly, J.S.,** (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. 1. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *Journal of Immunology*, pp. 344-350.
- Mutinga, M. & Ngoka, J.,** (1983). Investigation of animal reservoirs of visceral leishmaniasis and the isolation of *Leishmania major* in Marigat, Baringo District, Kenya. *International Journal of Tropical*, pp. 237-240.
- Myšková, J., Votýpka, J. & Volf, P.,** (2008). *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of medical*, pp. 133-138.
- Napie, L.E., Smith, R.O.A. & Gupta, C.R.,** (1933). The Infection of *Phlebotomus argentipes* from Dermal Leishmanial Lesions. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 173-177.
- Napier, L.E. & Smith, R.O.A.,** (1927). The Development of *Leishmania donovani* in the Gut of the Sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 713-716.
- Nigg, A. P., Zahn, S., Rückerl, D., Hölscher, C., Yoshimoto, T., Ehrchen, J. M., .. & von Stebut, E.,** (2007). Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, pp. 7251-7258.
- Nolan, T.J. & Farrell, J.P.,** (1987). Experimental infections of the multimammate rat (*Mastomys natalensis*) with *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, pp. 264-269.
- Paul, M., Durand, R., Boulard, Y., Fusai, T., Fernandez, C., Rivollet, D., .. & Astier, A.,** (1998). Physicochemical characteristics of pentamidine-loaded polymethacrylate nanoparticles: implication in the intracellular drug release in *Leishmania major* infected mice. *Journal of drug targeting*, pp. 481-490.

- Pearson, R. & Sousa, A. de Q.**, (1996). Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, pp. 133-137.
- Perlowagora-Szumlewicz, A. & Muller, C.A.**, (1982). Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease.
- 1-Comparative xenodiagnosis with nine Triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 37-53.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., .. & Sacks, D.**, (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, pp. 970-974.
- Peters, N.C. & Sacks, D.L.**, (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*, pp. 1289-1291.
- Peters, W. & Killick-Kendrick, R.**, (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. Volume II. Clinical aspects and control. *Academic press*, pp. 1-4.
- Pimenta, P., Modi, G. & Pereira, S.**, (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, pp. 359-369.
- Pozio, E., Maroli, M., Gradoni, L., & Gramiccia, M.**, (1985). Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 524-526.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C. A., & Liew, F. Y.**, (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European journal of immunology*, pp. 745-750.
- Pružinová, K., Sádlová, J., Šeblová, V., Homola, M., Votýpka, J., & Volf, P.**, (2015). Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PloS one*, p. e0128203.
- Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H., & Joiner, K. A.**, (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*, pp. 4311-4316.

- Quinnell, R. & Courtenay, O.,** (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, pp. 1915-1934.
- Ramalho-Ortigao, M. & Saraiva, E.,** (2010). Sand fly-Leishmania interactions: long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology*, pp. 245-264.
- Ramesh, V. & Mukherjee, A.,** (1995). Post kala-azar dermal leishmaniasis. *International journal of dermatology*, pp. 85-91.
- Rassi, Y., Javadian, E., Amin, M., Rafizadeh, S., Vatandoost, H., & Motazedian, H.,** (2006). *Meriones libycus* is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, pp. 474-477.
- Ready, P. D.,** (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, pp. 227-250.
- Ready, P. D.,** (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical epidemiology*, pp. 14-54.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.,** (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, pp. 581-596.
- Ribeiro, R., Moura, E. & Pimentel, V.,** (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome. *Antimicrobial agents*, pp. 87-93.
- Rioux, J. A., Petter, F., Akalay, O., Lanotte, G., Ouazzani, A., Seguignes, M., & Mohcine, A.,** (1982). *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842) [Rodentia, Gerbillidae] a reservoir of *Leishmania major*, Yakimoff and Schokhor, 1914 [Kinetoplastida, Trypanosomatidae] in South Morocco. *Comptes rendus des*, pp. 515-517.
- Risser, R. & Kaehler, D.,** (1985). Susceptibility to Abelson or Moloney murine leukemia viruses. *The BALB/c Mouse*, pp. 162-173.
- Rogers, M. E., Kropf, P., Choi, B. S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P. A., & Müller, I.,** (2009). Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathogen*, p. e1000555.
- Rogers, M. E., Hajmová, M. & Joshi, M.,** (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular*, pp. 411-420.

- Rogers, M. E., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A., & Bates, P. A.,** (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, pp. 463-467.
- Rogers, M. E., Chance, M. L. & Bates, P. A.,** (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, pp. 495-507.
- Rohoušová, I., Hostomská, J., Vlková, M., Kobets, T., Lipoldová, M., & Volf, P.,** (2011). The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *International journal for parasitology*, pp. 481-485.
- Ropert, C., & Gazzinelli, R. T.,** (2000). Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology*, pp. 395-403.
- Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S. J., & Pimenta, P. F.,** (1994). The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology*, pp. 55-62.
- Sacks, D. L. & Kamhawi, S.,** (2001). Molecular aspects of parasite - vector and vector - host interactions in Leishmaniasis. *Annual reviews in microbiology*, pp. 453-483.
- Sacks, D. L.,** (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental parasitology*, pp. 100-103.
- Sádlová, J., Myšková, J., Leštinová, T., Votýpka, J., Volf, P., Matthew, Y.,** (unpublished) *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections.
- Sádlová, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votýpka, J., Volf, P., & Smith, D. F.,** (2010). The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector. *Cellular*, pp. 1765-1779.
- Sádlova, J., Šeblová, V., Votýpka, J., Warburg, A., & Volf, P.,** (2015). Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model. *Parasites & vectors*, pp. 1- 6.
- Santrich, C., Segura, I., Arias, A. L., & Saravia, N. G.,** (1990). Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, pp. 51-55.

- Saravia, N. G., Holguín, A. & McMahon-Pratt, D.,** (1985). Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, pp. 77-84.
- Scott, P.,** (1989). The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology*, pp. 369-372.
- Scott, P. & Novais, F.O.,** (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Publishing Group*, pp. 1038-1045.
- Sharma, M. I. D., Suri, J. C., Kalra, N. L., & Mohan, K.,** (1973). Studies on cutaneous leishmaniasis in India. III. Detection of a zoonotic focus of cutaneous leishmaniasis in Rajasthan. *Journal of communicable diseases*, pp. 149-153.
- Sharma, U. & Singh, S.,** (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian journal of experimental biology*, pp. 445-451.
- Sherlock, I.,** (1996). Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 32-37.
- Shortt, H. E., Smith, R. O. A., Swaminath, C. S., & Krishnan, K. V.,** (1931). Transmission of Indian kala-azar by the bite of *Phlebotomus argentipes*. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 1373-1375.
- Shortt, H.E., Barraud, P.J. & Craighead, A.C.,** (1927). Transmission Experimente in Indian Kala-azar with *Phlebotomus argentipes*. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 589-600.
- Schenone, H.,** (1999). Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 289-294.
- el Sibae, M. M., Eesa, N. M. & Morsy, T. A.,** (1993). Rodents and cutaneous leishmaniasis in Qasim, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, pp. 667-73.
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., .. & Reiner, N. E.,** (2010). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *The Journal of Immunology*, pp. 5011-5022.
- Silverman, J. & Reiner, N.,** (2012). *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in cellular and infection*, pp. 126-132.

- Singh, O. P., Hasker, E., Sacks, D., Boelaert, M., & Sundar, S.,** (2014). Asymptomatic leishmania infection: a new challenge for leishmania control. *Clinical Infectious Diseases*, pp. 1424-1429.
- Singh, R., Kumar, D., Ramesh, V., Negi, N. S., Singh, O. P., & Salotra, P.,** (2006). Visceral leishmaniasis, or kala azar (KA): high incidence of refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, pp. 302-306.
- Sinha, P.K., Pandey, K. & Bhattacharya, S.K.,** (2005). Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 407-414.
- Skamene, E.,** (1985). Susceptibility of BALB/c sublines to infection with *Listeria monocytogenes*. In *The BALB/c Mouse Springer Berlin Heidelberg*, pp. 128-133.
- Smith, R.O.A., Halder, K.C. & Ahmed, I.,** (1940). Further investigations on the transmission of kala-azar. Part III. The transmission of kala-azar by the bite of the sandfly *P. argentipes*. *Indian Journal of Medical Research*, pp. 585-591.
- Soares, M. R. A., De Mendonca, I. L., do Bonfim, J. M., Rodrigues, J. A., Werneck, G. L., & Costa, C. H. N.,** (2011). Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, pp. 6-9.
- Stauch, A., Sarkar, R. R., Picado, A., Ostyn, B., Sundar, S., Rijal, S., .. & Duerr, H. P.,** (2011). Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS neglected tropical diseases*, p. e1405.
- Stierhof, Y. D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., & Ilg, T.,** (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*, pp. 675-689.
- Střelková M. V.,** 1996. Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Folia Parasitologica*, pp. 1-6.
- Svobodová, M., Votýpka, J., Pecková, J., Dvořák, V., Nasereddin, A., Baneth, G., .. & Schnur, L. F.,** (2006). Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases*, pp. 1860-1868.

- Svobodová, M., Votýpka, J., Nicolas, L., & Volf, P.,** (2003). *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and infection*, pp. 361-364.
- Svobodová, M., Volf, P. & Votýpka, J.,** (2006). Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hyraxes (*Procavia capensis*) by the bite of *Phlebotomus arabicus*. *Microbes and infection*, pp. 1691-1694.
- Sypek, J. P., Chung, C. L., Mayor, S. E., Subramanyam, J. M., Goldman, S. J., Sieburth, D. S., .. & Schaub, R. G.** (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of experimental medicine*, pp. 1797-1802.
- Šeblová V., Volfová, V., Dvořák, V., Pružinová, K., Votýpka, J., Kassahun, A., .. & Volf, P.,** (2013). *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS neglected tropical diseases*, p. e2187.
- Šeblová, V., Sádlová, J., Vojtková, B., Votýpka, J., Carpenter, S., Bates, P. A., & Volf, P.,** (2015). The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS neglected tropical diseases*, p. e0004060.
- Theodos, C., Ribeiro, J. & Titus, R.,** (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania infection* in mice. *Infection and Immunity*, pp. 1592-1602.
- Theodos, C. & Titus, R.,** (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite immunology*, pp. 481-484.
- Thiakaki, M., Rohoušová, I., Volfová, V., Volf, P., Chang, K. P., & Soteriadou, K.,** (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes and infection*, pp. 760-766.
- Titus, R. & Ribeiro, J.,** (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, pp. 101-114.

- Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., & Osorio, Y.,** (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, pp. 119-124.
- Travi, B., Arteaga, L. & Leon, A.,** (2002). Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 887-892.
- Travi, B., Osorio, Y. & Becerra, M.,** (1998). Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 275-278.
- Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., & Osorio, Y.,** (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 119-124.
- Verçosa, B. L. A., Lemos, C. M., Mendonça, I. L., Silva, S. M. M. S., De Carvalho, S. M., Goto, H., & Costa, F. A. L.,** (2008). Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC veterinary research*, p. 45.
- Vexenat, J., Castro, J. & Cavalcante, R.,** (1994). Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 131-135.
- Vieira, L. Q., Hondowicz, B. D., Afonso, L. C., Wysocka, M., Trinchieri, G., & Scott, P.,** (1994). Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. *Immunology letters*, pp. 157-161.
- Volf, P., Tesařová, P. & Nohýnkova, E.,** (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and veterinary*, pp. 1-6.
- Volf, P. & Volfová, V.,** (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, pp. 1948-1959.
- Wakelin, D.,** (1986). *The BALB/c Mouse. Genetics and Immunology. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Eds). M. Potter. ISBN 3 540 15834 0. Springer Verlag, Berlin

- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C., Titus, R. G., & Neva, F.,** (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, pp. 223-230.
- Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., .. & Liew, F. Y.,** (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *The BALB/c Mouse, Springer Berlin Heidelberg*, pp. 154-158.
- World Health Organization,** (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. pp. 1-253.
- World Health Organization,** (2015). WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - Leishmaniasis., p. e000067.
- Xu, D., Liu, H., Komai-Koma, M., Campbell, C., McSharry, C., Alexander, J., & Liew, F. Y.,** (2003). CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *The Journal of Immunology*, pp. 394-399.
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A. & Mohebbali, M.,** (1996). *Meriones libycus* and *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp.503-504.
- Yanik, M., Gurel, M. S., Simsek, Z., & Kati, M.,** (2004). The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, pp. 464-467.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., & Warburg, A.,** (2001). Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology*, pp. 810-814.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M., & El-Hassan, A. M.,** (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, pp. 87-98.